

INTER-AMERICAN TROPICAL TUNA COMMISSION

COMISION INTERAMERICANA DEL ATUN TROPICAL

Bulletin—Boletín

Vol. 20, No. 7

**VALIDATION OF DAILY GROWTH INCREMENTS AND ESTIMATION OF
GROWTH RATES OF LARVAL AND EARLY-JUVENILE BLACK SKIPJACK,
EUTHYNNUS LINEATUS, USING OTOLITHS**

**VALIDACION DE INCREMENTOS DIARIOS DE CRECIMIENTO Y ESTIMACION
DE TASAS DE CRECIMIENTO DE BARRILETES NEGROS LARVALES
Y JUVENILES TEMPRANOS, *EUTHYNNUS LINEATUS*, USANDO OTOLITOS**

by—por

Jeanne B. Wexler

La Jolla, California

1993

CONTENTS–INDICE

ENGLISH VERSION–VERSION EN INGLES

	Page
ABSTRACT	401
INTRODUCTION	401
METHODS AND MATERIALS	402
Collection of larvae and early juveniles	402
Otolith preparation and procedures	403
Validation of daily growth increments	404
RESULTS	406
Age validation	406
<i>In situ</i> age and growth	406
DISCUSSION	408
Otolith microstructure	408
Age validation	408
Growth	409
ACKNOWLEDGEMENTS	412

FIGURES–FIGURAS	413
-----------------------	-----

TABLES–TABLAS	420
---------------------	-----

VERSION EN ESPAÑOL–SPANISH VERSION

	Página
ABSTRACTO	423
INTRODUCCION	423
METODOS Y MATERIAS	425
Colección de larvas y juveniles tempranos	425
Procedimientos y preparación de los otolitos	425
Validación de los incrementos diarios de crecimiento	426
RESULTADOS	428
Validación de edad	428
Crecimiento y edad <i>in situ</i>	429
DISCUSSION	431
Microestructura de los otolitos	431
Validación de edad	431
Crecimiento	432
RECONOCIMIENTOS	435

LITERATURE CITED–BIBLIOGRAFIA CITADA	436
--	-----

VALIDATION OF DAILY GROWTH INCREMENTS AND ESTIMATION OF GROWTH RATES OF LARVAL AND EARLY-JUVENILE BLACK SKIPJACK, *EUTHYNNUS LINEATUS*, USING OTOLITHS

by

Jeanne B. Wexler

ABSTRACT

Increments in otoliths (sagittae) were examined, using light and scanning electron microscopy, to determine ages and estimate growth rates of larval and early-juvenile black skipjack, *Euthynnus lineatus*. Larvae and juveniles were collected between 1987 and 1989 from coastal waters of Panama in the eastern Pacific Ocean. Results from a laboratory experiment indicated that immersion for 6 and 12 hours in a 200 mg/L solution of tetracycline hydrochloride adequately marks otoliths and that increments are formed daily in the sagittae of postflexion larvae and early juveniles. Further, survival rates of tetracycline-treated fish were not significantly different from those of control fish. Growth rates were derived from length-age relationships of 218 field-collected specimens ranging in size from 5.7 to 20.3 mm SL. A growth rate of 0.70 mm/d was estimated from the weighted regression of standard length on age for all specimens. This rate lies within the range reported for larvae and early juveniles of other species of subtropical and tropical scombrids. Growth rates of postflexion larvae and early juveniles were not significantly different between the rainy season in July-August 1988 and the dry, upwelling season in January-February 1989. Growth was, however, significantly more variable for older individuals in July-August than in January-February, and may correspond, in part, to seasonal patchiness of prey. The growth rates of the otoliths relative to fish length were also not significantly different between seasons; however, the otoliths were larger relative to the lengths of fish collected in the rainy season, which may reflect slower growth during earlier larval stages.

INTRODUCTION

Otoliths are often the first calcified structures formed during the early development of teleost fishes. From a record of daily increment formation, otoliths can be used to determine age and growth parameters of larval and juvenile fishes (Campana and Neilson, 1985). Characterizing growth during early life stages may contribute to the understanding of cohort strength because small changes in growth rates can affect pre-recruit stage durations and subsequent mortality rates (Houde, 1987).

Establishing whether increments are formed daily is fundamental for determining growth relationships based on age determination using otoliths (Campana and Neilson, 1985; Jones, 1986). The confirmation of daily increment formation and a close relationship between somatic and otolith growth would make it possible to back-calculate individual growth rates and provide information on recruitment processes which may be size-specific (Campana and Neilson, 1985; Secor and Dean, 1992). Although several studies (Kendall and Gordon, 1981; Brothers *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1988; De Vries *et al.*, 1990; Jenkins and Davis, 1990; Lang, 1991) include descriptions of growth using ages determined from otolith analyses of larval and early-juvenile scombrids (family Scombridae), only one (Radtke, 1983) includes validation of daily increment formation. Radtke (1983) validated the daily deposition of growth increments in the otoliths of yolk-sac and first-feeding larvae of skipjack, *Katsuwonus pelamis*, for five days after hatching in the laboratory. Daily deposition rates have not been confirmed for late-stage larval (*i.e.* flexion and postflexion stages) and early-juvenile scombrids, although indirect methods of validation have been applied to southern bluefin, *Thunnus maccoyii*, using marginal increment analysis (Jenkins and Davis, 1990) and king and Spanish mackerel, *Scomberomorus cavalla* and *S. maculatus*, using frequency distributions of observed and back-calculated sizes (De Vries *et al.*, 1990). (Developmental stages (preflexion, flexion, postflexion, and

transitional, early-juvenile) are based on the stages of notochord development and follow the definition of Ahlstrom *et al.*, 1976.)

In situ growth rates, all based on otolith analyses, have been estimated for the larvae and early juveniles of only a few subtropical and tropical species of scombrids occurring in the Atlantic (Collins *et al.*, 1988; De Vries *et al.*, 1990; Lang, 1991) and Indian Oceans (Jenkins and Davis, 1990). *In situ* growth rates for the early life stages of scombrids in the eastern Pacific Ocean have not been reported, although growth rates in captivity have been estimated for postflexion larval and early-juvenile black skipjack, *Euthynnus lineatus* (Clemens, 1956; Olson and Scholey, 1990). Larval and juvenile scombrids occurring in warm seas have the potential for rapid growth and high ingestion rates (Houde, 1989), but can also exhibit high variability in growth due to competition and food availability (Jenkins *et al.*, 1991). Reported growth rates have ranged from 0.32 to 0.47 mm/d for larval (preflexion and flexion stages) king mackerel (Collins *et al.*, 1988), southern bluefin (Jenkins and Davis, 1990), and yellowfin, *Thunnus albacares*, (Lang, 1991), and 0.89 to 1.15 mm/d for both larval (flexion and postflexion stages) and early-juvenile king and Spanish mackerel (De Vries *et al.*, 1990).

In this study, age and growth of larval (flexion and postflexion stages) and early-juvenile black skipjack, collected off the Pacific coast of Panama, were estimated from otolith microstructure. Black skipjack is a neritic and oceanic species within the tribe Thunnini (true tunas) that occurs in subtropical and tropical waters of the eastern Pacific Ocean and occasionally near the Hawaiian Islands (Collette and Nauen, 1983). Although the species is of only minor commercial importance, the growth dynamics during early life may be comparable to those of other tropical tunas. The larvae and juveniles of black skipjack are found commonly in neritic, tropical waters of the eastern Pacific Ocean (Klawe, 1963; Klawe *et al.*, 1970; Moser *et al.*, 1974; Olvera *et al.*, 1990; Anonymous, 1992), but less frequently in oceanic environments (Calkins and Klawe, 1963; Yoshida, 1979; Nishikawa *et al.*, 1985). Black skipjack tunas are multiple spawners that exhibit geographically distinct periods of protracted spawning in coastal and offshore waters from Mexico to the Gulf of Panama (Schaefer, 1987). In the Panama Bight, spawning occurs in most months of the year during seasonal fluctuations of coastal upwelling and precipitation; however, peak spawning occurs during the coastal upwelling period of January through March (Schaefer, 1987) when primary and secondary productivity levels are higher (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969). The seasonal effect of coastal upwelling and food availability on growth of early life stages of scombrids in the Panama Bight is unknown, and may be an important factor influencing the feeding success and survival during pre-recruit stages. The occurrence of black skipjack larvae and juveniles during most months of the year in the Panama Bight provides an opportunity to compare growth between a season of pronounced coastal upwelling and one of reduced upwelling and lower productivity.

The objectives of this study were to use the sagittae (the largest of the three pairs of otoliths) of larval and early-juvenile black skipjack collected in the Panama Bight to: 1) determine whether increments are formed daily and the appropriate methodology to mark otoliths and minimize fish mortality; 2) estimate an average growth rate from the length-age data; and 3) evaluate the seasonal influence of coastal upwelling and food availability on somatic and otolith growth.

METHODS AND MATERIALS

Collection of larvae and early juveniles

Specimens were collected in the northwest portion of the Panama Bight, near the Inter-American Tropical Tuna Commission's (IATTC) Achotines Laboratory, located on the Azuero Peninsula in the Republic of Panama (Fig. 1). Two seasons are characteristic of the Panama Bight

area (Forsbergh, 1963, 1969; Anonymous, 1992). A dry season, which extends from December through April, is characterized by low rainfall, lower sea-surface temperatures (Fig. 2) and pronounced, coastal upwelling associated with northerly winds. Heavy precipitation, higher sea-surface temperatures (Fig. 2), and reduced upwelling conditions typically occur during the rainy season of May through November.

Larval and early-juvenile black skipjack were collected between December of 1987 and February of 1989 (Table 1) for growth analyses and in July-August of 1990 for laboratory experiments. They were collected approximately 3.5-6.5 nmi offshore from the Achotines Bay in the vicinity of the 100- and 200-m isobaths (Fig. 1). Sea-surface temperatures were recorded during sampling operations (Fig. 2; Table 1). The fish were captured by means of nightlighting, in which they are attracted to an underwater light (24-volt DC, 300-watt) at night, and captured with a dip net. The light was lowered to 15 m for approximately 5-10 min, and then raised to 1 or 2 m below the surface, where the fish were captured. Specimens were preserved immediately in 95-percent ethanol buffered with TRIS (tris[hydroxymethyl]-aminomethane). The TRIS buffer maintains a neutral pH in ethanol and prevents otolith degradation during long-term storage (J. Butler, National Marine Fisheries Service, pers. comm.). Fish that were collected for live transfer to the laboratory were placed in polyethylene bags (40-L capacity) containing aerated seawater and a water conditioner that replenishes the natural mucous coating during capture and handling. Fish that survived the transfer were used for laboratory experiments, while those that died upon arrival to the laboratory (*i.e.* those that had been dead for less than one hour before preservation with no apparent signs of tissue degradation) were also preserved in buffered ethanol and used for the ageing and growth analyses. Ethanol was replaced after 24 h. Prior to otolith extraction, all preserved specimens were placed in distilled water to soften the body and facilitate measurement. The standard length (SL) was measured to the nearest 0.1 mm using a dissecting microscope and ocular micrometer. SL was not corrected for shrinkage due to preservation; however, preliminary analysis indicates that less than 5-percent shrinkage occurs for postflexion larvae and early juveniles preserved in 95-percent buffered ethanol. Any shrinkage in body length that may have occurred during the time between death and fixation in ethanol (Jennings, 1991) was probably minimal, because the specimens collected for this study were undergoing ossification associated with metamorphosis. Studies have shown that this type of shrinkage decreases with age and development of ossified structures (Theilacker, 1980; Radtke, 1989; Jennings, 1991).

Otolith preparation and procedures

Sagittae were extracted from each specimen, cleaned in sodium hypochlorite (household bleach) and distilled water, and mounted distal-side-up on a glass slide in EUKITT mounting medium. Cleaning the otoliths in bleach did not cause erosion and provided a clearer image of increments. The surface of each sagitta was polished before counting the increments with a light microscope (LM) at magnifications between 720 and 1200 \times . Criteria to distinguish subdaily increments from daily increments in adult yellowfin tuna (Wild 1986) were used to identify and count increments in this study. The number of increments on the rostrum (anterior-most projection of the sagitta) was not significantly different from that on the postrostrum (posterior-most projection of the sagitta) ($n = 20$; t -test, $t_{0.05(2),19} = 1.08$, $P > 0.20$). Therefore, three to eight independent counts (*i.e.* each sample was counted three to eight different times without prior knowledge of the previous counts) were made by one reader from the core to the outer edge of either projection in both sagittae of all specimens. For each pair, the average number of increments in the sagitta that was more clearly read (and usually resulted in a higher average count of increments) was used as a direct estimate of age in days. Four specimens were rejected because the coefficient of variation of their replicated counts

in either sagitta was greater than the precision criterion of 5 percent. Sagitta radii were measured from the center of the primordium (the initial point of growth within the otolith core) to the outer edge of the rostrum and postrostrum, using an ocular micrometer. The rostrum radius was used to examine otolith and somatic growth relationships because the postrostrum radius measurement did not yield a simple linear relationship with fish length. It was not possible to measure the radii of sagittae for four specimens due to damage during preparation.

In order to confirm counts made using the LM, sagittae from a subsample of eight fish were prepared for examination under a scanning electron microscope (SEM). Before the otolith was prepared for the SEM, the counting path and the average of three or four independent counts of increments were determined on the distal surface of one sagitta from each pair using the LM. Each sagitta was embedded in a Castolite resin mold. The dry resin mold was cut parallel to the ventral-dorsal edges of the otolith, and the otoliths were ground and polished in a frontal plane using 600, 30 and 0.3 μm grit paper, followed by 0.05 μm alumina powder. Sagittae were etched with 0.05 N HCl for 5-7 seconds, followed by rinses in distilled water, bleach, and distilled water again. The bleach rinse dislodges the organic matrix in the discontinuous zone, creating grooves between the incremental zones (Watabe *et al.*, 1982). The sagittae were then mounted on SEM stubs, gold-coated, and photographed at 1500-7000 \times magnification, using a Cambridge SEM. Three or four independent counts of increments on each sectioned sagitta were made from the SEM micrographs and the averaged counts compared with those of the LM. For three specimens, the interpretation of increments counted from the SEM micrographs was more difficult than interpretation of those seen with the LM. Therefore, replicated counts with a coefficient of variation of 7 percent or less were accepted for comparison of the two techniques.

Validation of daily growth increments

In August of 1990, an immersion experiment using tetracycline hydrochloride (THCL) was conducted at the Achotines Laboratory to test the hypothesis that increments are formed daily in the sagittae of larval and early-juvenile black skipjack. The experiment was also designed to determine an effective concentration and exposure period that would mark the sagittae and minimize fish mortality. The concentration of THCL and the exposure periods selected for this experiment were based on results from preliminary investigations by IATTC personnel. (Calcein was also tested as a temporal marker in the otoliths of larval and early-juvenile black skipjack during July of 1990 (Anonymous, 1992). However, the results are considered preliminary because treatment techniques were not yet refined, and are therefore not presented here.)

Immediately following capture and arrival to the laboratory, black skipjack were placed in 1.5 m-diameter tanks containing 571 L of aerated, filtered seawater. After an acclimation period, similar-sized individuals were randomly captured and transferred to a 100 mg/L anesthetic solution of MS 222 (tricaine methanesulfonate) for approximately 20 seconds. The SL was measured to the nearest 0.1 mm using calipers, and the fish were then placed in randomly-assigned, 1.2 m-diameter tanks containing 303 L of aerated, filtered seawater.

During the acclimation and experimental periods, all fish were fed wild zooplankton (predominantly copepods) size-graded between 333-1000 μm and at concentrations of 50-100 plankters/L. The size grading was based on the range of prey widths selected by postflexion larval Pacific mackerel, *Scomber japonicus* (Hunter, 1981). The food levels used were representative of moderate to high densities of copepod nauplii and copepodites occurring in coastal, upwelling systems (Houde, 1978). Nominal food levels were maintained in each tank by calculating the mean of two 200-mL aliquots taken 3-4 times daily.

The water quality, temperature, salinity and light levels in all tanks were monitored daily.

Partial water changes of 25-50 percent were made twice daily to reduce the buildup of metabolites. Daily ammonia levels were always less than 0.1 mg/L. Water was pumped from Achotines Bay to a reservoir tank and fed by gravity through 5- and 1- μ m cartridge filters to laboratory tanks. This water delivery system allowed for some diel fluctuation in temperature. Water temperatures, recorded three times daily at 0600, 1200, and 1800 h, ranged from 24.3 to 27.7°C during the experiment. Salinity levels fluctuated between 31 and 33‰. All fish were exposed to a diel light cycle (13 h light : 11 h dark); indirect natural light was supplemented by fluorescent lighting over all tanks and measured 1000-2100 lux at the water's surface.

Following an acclimation period of 36-72 h, nine black skipjack were placed in each of six tanks (one control group, two treatment groups; each group with two replicates). The fish were allowed to acclimate for an additional 24 h before immersion in the THCL solution. For each of the two treatment groups, THCL was mixed in a 100-L reservoir of seawater and siphoned into two replicate tanks simultaneously for a final concentration of 200 mg/L. All THCL treatments were conducted at night (between 1800 and 0730 h) because exposure of THCL to ambient light can adversely affect the fluorescent properties of tetracycline (Weber and Ridgeway, 1967; Lorson and Mudrak, 1987). Immersion periods for the two treatment groups were 6 (1800-0000 h) and 12 h (1920-0720 h), respectively. The fish in the control tanks were treated the same as those in the 12-h treatment tanks, but THCL was not added. After each immersion period, complete water changes were made in all control and treatment tanks. The fish were maintained as described previously for the 7-day duration of the experiment.

After seven days, the fish were measured and preserved in 95-percent buffered ethanol. The sagittae were prepared as described previously and examined at 480 \times magnification using an epifluorescence LM. THCL marks were identified in the otoliths using ultra-violet light emitted from a 200-watt mercury burner. Excitation wave length was limited by a combination of BG-12 and V (455 nm) filters, and autofluorescence was minimized with a 530-nm barrier filter.

The number of increments following the THCL mark in each sagitta was counted three times, and the mean count was used to determine the rate of increment formation. The mean value of increments counted was compared between treatments and to the expected value of seven increments (= days post-immersion). Counts were verified by comparing the mean counts with those from a second, experienced reader (T.J. Foreman, IATTC) who had no previous knowledge of the known-age material.

To determine which THCL treatment minimized mortality, daily survival rates (DSRs) were calculated for treatments and controls with the following equation (DeMaster and Drevenak, 1990):

$$DSR = 1 - \frac{\sum_{i=1}^k (y_i)}{\sum_{i=1}^k (x_i)}$$

where

DSR = average daily survival rate;

y_i = 1 if the i th individual died during the experimental period, and 0 if the i th individual survived the duration of the experiment;

x_i = number of days survived by the i th individual ("fish-days"), including the day when death occurred; and

k = number of fish in the treatment or control group.

DSRs were adjusted for fish killed during cannibalism attempts which occurred in two of the tanks after the fifth day of the experiment. It was assumed, based on the high survival rates that occurred

in the other tanks, that the attacked fish would have survived through the duration of the experiment. The 95-percent confidence interval for the DSR was calculated directly from a binomial distribution (DeMaster and Drevenak, 1990). The differences among DSRs within and between the treatment and control groups were tested with the variance test for homogeneity of the binomial distribution (Snedecor and Cochran, 1967). The DSRs for replicates were pooled if they were not significantly different at the 5-percent level.

The intensity of the fluorochrome mark in each sagitta was ranked subjectively as either good or excellent to determine if the intensity of the marks was independent of treatment effects. Similarities in the proportion of good marks between replicates were tested using the Fisher exact test (Siegel, 1956). The mark intensities for each replicate were pooled if they were similar and a chi-square analysis (Zar, 1984) was used to determine if the different treatments affected the intensity of the mark.

RESULTS

Age validation

The initial and final sizes of black skipjack in the immersion experiment ranged from 12.6 to 16.9 and 21.1 to 39.6 mm SL, respectively. Initial and final mean sizes were not significantly different among tanks (analysis of variance, $F_{(0.05,2)} = 1.36$, $P > 0.20$ and $F_{(0.05,2)} = 1.05$, $P > 0.20$, respectively). Throughout the 7-day experiment, the pooled DSRs were high (> 0.96) (Table 2) and not significantly different among the 6-h, 12-h, and control groups ($\chi^2_{0.05,2} = 1.25$, $0.50 < P < 0.75$). Both THCL treatments produced good marks in the sagittae of all fish examined (Fig. 3). The proportion of good marks was the same for replicates within the 6- and 12-h treatments (Fisher exact test, $P = 0.333$ and $P = 1.000$, respectively). However, the intensity of the marks was proportional to the lengths of time the fish were immersed in THCL ($\chi^2_{0.05,1} = 15.0$, $P < 0.001$). Although both treatments resulted in good marks, the 12-h immersion produced brighter marks. The location of the THCL mark corresponded to the time of formation of the increment within a 24-h period. Most marks were concentrated either in the middle (6-h treatment) or within the outer half (12-h treatment) of the incremental zone.

The results of the THCL experiment support the hypothesis of daily increment deposition. The mean number of increments from the 6- and 12-h treatments (Table 3) were not significantly different ($t_{0.05(2),25} = 0.39$, $P > 0.60$), and the pooled, mean number was also not significantly different from the expected value of seven increments ($t_{0.05(2),26} = 0.298$, $P > 0.50$) (Fig. 3; Table 3). Verification of daily increment counts was supported by the close agreement of both readers. The mean difference between increment counts of each reader was not significant (paired sample t -test, $t_{0.05(2),26} = 1.13$, $0.20 < P < 0.50$).

In situ age and growth

Typically, the first nine increments in the sagittae of field-preserved specimens were well defined, but after the ninth increment they became increasingly difficult to differentiate from subdaily increments. The width of the incremental zones gradually increased from the first to the ninth increment. In most otoliths, the width of the incremental zones became more variable between increments 9 and 23. One to three narrow zones were followed by a wider zone at various intervals (Fig. 4). The narrowest incremental zone measured was $1.5 \mu\text{m}$ in width, which is well above the resolution limits ($0.20\text{--}0.25 \mu\text{m}$) of the LM used (Eastman Kodak Co., 1980; Campana *et al.*, 1987).

The increment counts obtained with the SEM confirmed those obtained with the LM. The discontinuous zones appeared as narrow grooves and were distinguishable from the incremental zones

(Fig. 5). The average number of increments counted using the SEM and the LM (Table 4) were not significantly different (Wilcoxon paired-sample test, $T_{+(0.05,8)} = 13.5$, $T_{-(0.05,8)} = 21.5$, $P > 0.50$; paired-sample t -test, $t_{0.05(2),7} = 0.17$, $P > 0.50$). The same pattern of increment widths in whole otoliths observed with the LM (Fig. 4) was also apparent in the SEM preparations (Fig. 6).

A total of 226 black skipjack larvae and early juveniles were collected for age and growth analyses (Table 1). Average sea-surface temperatures recorded during collection of the specimens ranged from 24.4 to 28.5°C (Fig. 2; Table 1). SL, measured for 222 specimens, ranged from 5.7 to 20.3 mm. Postflexion larvae between 8 and 10 mm were predominant (mode = 9.5 mm; mean = 10.1 mm). Increments were counted in the sagittae of 222 fish and ages were estimated to be between 6 and 23 days (mode = 10.0 days; mean = 11.6 days), based on the validated rate of one growth increment per day.

The growth of black skipjack was described from the length-age data of specimens over the entire size range of 5.7–20.3 mm SL (Fig. 7; Table 1). Inspection of the residuals from the data fitted by a linear, unweighted regression indicated that the observations had unequal variances. The homogeneity was tested by grouping the data into seven age intervals that had approximately similar variances in SL and equal numbers of observations. The variances were heterogeneous among the seven groups (Bartlett's test, $\chi^2_{0.05,6} = 69.64$, $P < 0.001$). Therefore, a weighted regression was applied to the length-age data (Fig. 7). For each of the seven groups, the inverse of the variance (*i.e.* the mean square error) (w) and the average age in days (\bar{X}) were fitted by the exponential model

$$\hat{w} = 1.56e^{-0.165\bar{X}}$$

$$(n = 7; r^2 = 0.80).$$

The values of \hat{w} were used as weights in the regression of SL on age in days. The relationship is described by the equation,

$$SL = 2.01 + 0.70AGE$$

$$(n = 218).$$

There was no significant lack of fit for this linear model based on repeated measurements at ages between 7 and 17 days ($F_{0.05(2),72,144} = 1.32$, $0.10 < P < 0.20$) (Draper and Smith, 1981). The narrow age range examined and the large and increasing variance in size-at-age make it difficult to determine the shape of the growth trajectory (Fig. 7). Other growth models did not fit the data better than the linear model (coefficients of determination adjusted for degrees of freedom: linear, logarithmic, Gompertz, von Bertalanffy, $r^2 = 0.68$; power function, $r^2 = 0.67$; exponential, $r^2 = 0.65$). Growth may be declining beyond 17 days of age, but the sample is too small to determine if this was due to an actual decline or a sampling artifact. The apparent decline may influence the slope of the regression by underestimating the growth rate. However, a weighted regression model applied to the data for fish aged between 6 and 14 days indicated only a slight increase in the growth rate to 0.74 mm/d (± 0.06 SD). Therefore, the younger fish do not appear to be growing at a significantly faster rate than those older than 14 days. The linear model fitted to the entire data set thus provides the best estimate of the average growth rate, 0.70 mm/d (± 0.04 SD), for black skipjack in the indicated size range.

Linear relationships of the length-age and the otolith size-fish length data of black skipjack collected in July and August, during the rainy season, and in January and February, during the dry

(upwelling) season, were compared for fish aged from 8.0 to 16.5 days. The age range used allowed for inclusion of all specimens from the dry season. Linear regressions for the length-age data, however, could not be compared with analysis of covariance (ANCOVA) because their variances were not homogeneous ($P < 0.005$) (Fig. 8). For the rainy season, the variance was significantly greater ($P < 0.02$) for fish older than 14 days. For fish 8 to 14 days old, however, the variances were homogeneous for the two seasons ($P > 0.20$). Therefore, linear regressions were fitted to the two truncated subsets of data (Fig. 8). Although the growth rate was greater during the rainy season (0.90 ± 0.11 mm/d) than during the dry season (0.70 ± 0.13 mm/d), the difference between the regression coefficients was not significant (ANCOVA, $F_{0.05(1),1,37} = 1.18$, $P > 0.20$). The common regression coefficient and the growth rate were 0.84 mm/d. The rate of otolith growth in radius length relative to fish growth in standard length was also not significantly different between seasons (ANCOVA, $F_{0.05(1),1,63} = 0.34$, $P > 0.50$) (Fig. 9). A test for equality of the adjusted means, however, was significant (ANCOVA, $F_{0.05(1),1,63} = 9.07$, $P < 0.005$) and indicated that fish sampled in the rainy season had relatively larger otoliths than those in the dry season. The standard error of estimate for each regression was 12.9 and 10.8 for data from the rainy and dry seasons, respectively.

DISCUSSION

Otolith microstructure

The sagitta microstructure of black skipjack is similar to that of other scombrids (Brothers *et al.*, 1983; De Vries *et al.*, 1990; Jenkins and Davis, 1990) although some differences are apparent. Brothers *et al.* (1983) and Radtke (1983) reported that two optically dense layers surround the primordium in the sagittae of larvae of Atlantic bluefin (*Thunnus thynnus*) and skipjack. This was not observed by Jenkins and Davis (1990) in southern bluefin, nor in black skipjack in this study. During approximately the first nine days of development in black skipjack, sagitta increments were well-defined, and the incremental zones gradually increased after the first increment. The increments then became less distinct and occurred at subdaily intervals among older individuals in the transitional period from the postflexion larval to early-juvenile stage. A change in the increment width pattern (*i.e.* narrowly- and more widely-spaced incremental zones) also occurred beyond the ninth or tenth increment on most otoliths (Figs. 4 and 6) and may reflect a change in somatic growth during juvenile metamorphosis. Otolith microstructure reflected the planktonic larval phase and juvenile metamorphosis in French grunt, *Haemulon flavolineatum*, (Brothers and McFarland, 1981) and two species of tropical reef fish (Victor, 1982). Also, a decrease in increment width in fish larvae and juveniles occurred in field and laboratory studies during periods of diet changes (Eckmann and Rey, 1987), food deprivation (Volk *et al.*, 1984; Neilson and Geen, 1985; Eckmann and Rey, 1987; Butler, 1989; Karakiri and Hammer, 1989; Maillet and Checkley, 1990), and reduced water temperatures (Gutiérrez and Morales-Nin, 1986; Eckmann and Rey, 1987; Karakiri and Hammer, 1989; Brothers, 1990). Increment width patterns in the otoliths of black skipjack could similarly be influenced by metamorphosis and small fluctuations in temperature and food availability, and further studies designed to examine these relationships are necessary.

Age validation

The otolith-marking experiment indicates that increments are formed daily in the sagittae of black skipjack over the size range of 12.6–39.6 mm SL when the fish are exposed to a natural photoperiod and fed moderate levels of wild zooplankton. Other experimental factors can influence increment deposition. The effects of temperature and food levels are species-specific, and can affect the daily pattern of increment formation in the otoliths of larvae and early juveniles (Campana and

Neilson, 1985; Neilson and Geen, 1985; Eckmann and Rey, 1987; Bailey and Stehr, 1988; Karakiri and Hammer, 1989; Maillet and Checkley, 1990; Hales and Hurley, 1991). Although temperature fluctuations were not controlled during my experiment, and varied as much as 3.4°C in a 24-hour period, they did not appear to influence the diel rhythm of increment formation.

The results of the immersion experiment also demonstrate the value of THCL as a suitable fluorochrome for marking otoliths and validating ages of postflexion larval and early-juvenile black skipjack. Neither the survival of the fish (Table 2) nor the rate of increment deposition (Table 3) were affected by the duration of immersion (6- and 12-h periods) in a 200 mg/L THCL solution. The quality of the mark, however, was enhanced by increasing the time of exposure from 6 to 12 h. The rapid incorporation of THCL, within 6 h of immersion, permits accurate age estimates of larval and early-juvenile black skipjack.

The location of the tetracycline mark in the incremental zone corresponding to the time of immersion and the number of complete increments following the mark indicate a diel incremental growth pattern that is formed at the beginning of the light phase and ends within a few hours of the following light phase. This incremental growth pattern is similar to that reported for goldfish, *Carassius auratus* (Mugiya *et al.*, 1981), and tilapia, *Tilapia nilotica* (Tanaka *et al.*, 1981). In contrast, marginal increment analyses of pleuronectid (Jenkins, 1987) and southern bluefin tuna larvae (Jenkins and Davis, 1990) indicated that daily increments were formed between the end of one light phase and the end of the next one. Although my direct validation methods were not performed under completely natural conditions in the laboratory, error in the determination of daily increment formation seems less likely from direct validation methods (chemical marking or known-age validation), than from indirect methods (De Vries *et al.*, 1990; Jenkins, 1987; Jenkins and Davis, 1990).

The timing of first increment formation in the otoliths of black skipjack larvae was not determined in this study. However, Radtke (1983) reported that increments were first observed in the sagittae of skipjack larvae one day after hatching. Although this has not been confirmed for other species in the tribe Thunnini, validation results for this closely-related tropical species indicate that the timing of first increment formation may be similar in the otoliths of black skipjack larvae. Typically, early developmental patterns are similar for tropical tuna species, and formation of increments in the otoliths may also be similar (Brothers *et al.*, 1983). A delay in formation of the first increment would cause underestimates of the ages and affect the biological interpretation of the growth model for black skipjack. The model predicts that the SL of black skipjack is 2.01 mm (\pm 0.40 SD) at hatching, which is the same as that reported for kawakawa, *Euthynnus affinis*, (Delsman, 1926) and which lies within the reported size ranges at hatching for little tunny, *Euthynnus alletteratus* (1.8-3.0 mm notochord length, Mayo 1973; and 2.5-3.0 mm total length, Houde and Richards 1969; Richards 1989). However, the large standard deviation of the intercept of the growth equation may indicate variability in the size or age of black skipjack at which the first increment is formed. Nevertheless, an error of one or two days from the time when the first increment is formed would not change the growth rate calculated from the growth model.

Growth

This study provides the first *in situ* growth estimates for larval and early-juvenile scombrids in the eastern Pacific. The average growth rate of 0.70 mm/d estimated for larval and early-juvenile black skipjack lies within the range of *in situ* growth rates reported for other subtropical and tropical scombrid larvae and juveniles and obtained from otolith increment analyses. Slower rates of growth have been reported for preflexion and flexion larvae of southern bluefin (0.32 mm/d) (Jenkins and Davis, 1990), yellowfin (0.47 mm/d) (Lang, 1991), and king mackerel (0.47 mm/d) (Collins *et al.*, 1988). In contrast, higher growth rates have been estimated for flexion and postflexion larvae of king

mackerel (0.89 mm/d) and flexion and postflexion larvae and early juveniles of Spanish mackerel (1.15 mm/d) (De Vries *et al.*, 1990).

The wide range of growth rates reported for larval and early-juvenile scombrids may be due to stage- and morphology-specific growth. Growth of bullet tuna, *Auxis rochei*, (Harada *et al.*, 1973), frigate tuna, *Auxis thazard*, (Harada *et al.*, 1973), yellowfin (Harada *et al.*, 1980), and Pacific mackerel (Hunter and Kimbrell, 1980) larvae hatched from artificially-fertilized eggs in the laboratory and southern bluefin larvae (Jenkins and Davis, 1990) described from field analyses is typically slow and almost linear during the early larval stages of development (preflexion and flexion), but increases rapidly during the latter stages. Also, the general morphology may determine the type of growth gradient for a species (Fuiman, 1983). Growth of some elongate scombrid species, such as *Scomberomorus* spp. and *Auxis* spp., may be concentrated in length, rather than in depth and/or breadth, during the early stages of development. In contrast, the growth of more robust species (*e.g.* *Euthynnus* spp. and *Thunnus* spp.) may be pronounced in depth and breadth. Because species-specific morphology may influence growth rates of scombrids, growth studies should include weight-specific growth estimates, in addition to estimates based on length.

Inter- and intra-specific differences in growth may also be related to the distribution of scombrid larvae and juveniles in different oceanic and neritic upwelling systems. Larval southern bluefin inhabiting oligotrophic waters of the eastern Indian Ocean (Jenkins and Davis, 1990) have lower growth rates than yellowfin larvae found in eutrophic waters of the Gulf of Mexico near the discharge plume of the Mississippi River (Lang, 1991). Lang (1991) also estimated lower growth rates for yellowfin larvae located in frontal waters of the Mississippi River plume compared to those located in shelf waters where size-selective predation was hypothesized to have occurred. Despite inter- and intra-specific growth differences, early developmental stages of scombrids occurring in subtropical and tropical seas are generally characterized by the potential for faster and more variable growth rates than those of fish inhabiting more temperate latitudes (Houde, 1989).

The growth rate estimated for larval and early-juvenile black skipjack is slightly lower than might be expected for this species, given their growth potential in captivity (Clemens, 1956; Olson and Scholey, 1990) and their distribution in seasonally variable, but fairly productive, waters of the eastern Pacific Ocean (Blackburn *et al.*, 1970; Fiedler *et al.*, 1991). Clemens (1956) obtained an average growth rate in length of 3.1-3.6 mm/d for 10 early juveniles fed an unspecified ration of food while held in captivity for 12 days. Olson and Scholey (1990) also obtained high but variable growth rates between 1.0 to 4.8 mm/d for late larvae and early juveniles held for 15 days while being fed to satiation. The high growth rates were maintained between 15 and 50 days in captivity and declined thereafter. These laboratory growth rates probably represent the maximum growth potential of black skipjack and may not represent natural rates in the field.

Regardless, the laboratory growth rates provide some evidence that black skipjack collected by nightlighting are on average growing at approximately 70% or less of their growth potential. Possible explanations for the lower rate of growth observed in nature are: 1) food availability (*i.e.* food-limited growth); 2) metabolic expenditure associated with predator avoidance and prey-searching activity; 3) size-selective mortality of fast-growing individuals; 4) use of sampling gear which selects for slow-growing individuals; or 5) allometric changes in body morphometry during metamorphosis. There is no evidence that mortality is occurring for a disproportionate number of fast-growing individuals, nor does it seem likely that nightlighting is biased in selecting for slow-growing individuals, given that relatively high ingestion rates are required in order for larvae to survive in warm seas (Houde, 1989). Further, indices of nutritional condition of postflexion larval and early-juvenile black skipjack indicated that individuals captured by nightlighting during the rainy season in the Panama Bight during 1988 were predominantly healthy (Margulies, 1993). Therefore, although slower-

growing individuals in poor condition would be easily captured, they are apparently not represented in the nightlighting collections. A short-term reduction in growth is not apparent during metamorphosis from the postflexion to early-juvenile stage in the laboratory (Olson and Scholey, 1990). However, there is some indication from the otolith morphology and microstructure that brief periods of slower growth may occur in the wild during early-juvenile metamorphosis (see previous discussion on otolith morphology). The more likely explanations for lower growth rate estimates of black skipjack in nature are patchiness of prey, lower background levels of food, and the high activity and energy levels needed to avoid predation and to search for prey organisms (Hunter, 1981).

Differences in growth were not statistically significant between the dry, upwelling season and the rainy season, despite reported differences in productivity levels in the Panama Bight during the two seasons (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969; Anonymous, 1992). Past (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969) and more current (Anonymous, 1992) studies indicate that primary and secondary productivity levels were 2-3 times higher in the dry than in the rainy season. The higher growth rate observed for fish between 8 and 14 days of age during the rainy season may only be a sampling artifact due to small sample sizes. Regardless of the limited data, late-stage larvae and early juveniles appear to be proficient feeders even during periods of lower productivity when prey organisms are possibly patchy in distribution (Owen 1989). Although otoliths were growing at the same rate relative to fish length for each season, fish sampled in the rainy season had relatively larger otoliths than those in the dry season. Several studies (Mosegaard *et al.*, 1988; Reznick *et al.*, 1989; Secor and Dean, 1989; Casselman, 1990; Wright, *et al.*, 1990; Moksness, 1992; Secor and Dean, 1992) have demonstrated that larger otoliths are indicative of slower growth. Because slower growth was not evident among postflexion larvae and juveniles sampled during the rainy season, it may have occurred during earlier stages of development. Margulies (1993) observed a higher incidence of starvation in preflexion larvae than in postflexion larvae during the rainy season of 1988. This suggests that seasonal variations in food availability and/or temperature may have a pronounced effect on nutrition and survival of preflexion-stage larvae and could also influence growth during early development. Although it is apparent that otoliths were larger in fish sampled during the rainy season, the variance of the growth relationships for each season was large relative to the range of available data, indicating the need for further sampling and analyses of seasonal growth differences of all early life stages.

A close correspondence between somatic and otolith growth at a daily level is useful in back-calculating stage- and age-specific growth using increment width measurements. However, because there was an indication of seasonal differences in the otolith and somatic growth relationships of black skipjack, a simple linear relationship between fish and otolith size would introduce bias in back-calculation procedures (Campana, 1990). More complex regression models incorporating age (Secor and Dean, 1992) and temperature (Mosegaard *et al.*, 1989) should be developed for further application.

The greater variability in growth of older early-juvenile black skipjack sampled during the rainy season could reflect variability in the transition to a piscivorous diet and the spatial distribution (*i.e.* patchiness) of prey. Captive rearing studies indicate that postflexion larvae and early juveniles are capable of switching from a zooplankton to a fish diet, which results in high, but variable rates of growth (Olson and Scholey, 1990). Also, observations in the laboratory (Margulies, 1993; this study) indicate that postflexion larvae readily accept zooplankton in their diet but also become cannibalistic during the postflexion and early-juvenile stages. Further, most scombrid species which have been studied become piscivorous and cannibalistic during the postflexion stage (Mayo, 1973; Hunter and Kimbrell, 1980; Young and Davis, 1990) and during earlier stages of development for *Scomberomorus* spp. (Jenkins *et al.*, 1984; Finucane *et al.*, 1990). Piscivory may provide a growth advantage for individuals switching from a zooplankton diet, and the timing and intensity of piscivory may correspond

to the spatial distribution of prey, resulting in variable growth of older individuals during the rainy season. There is some evidence of patchiness of larval prey organisms during the rainy season of 1988 in the Panama Bight, based on the relationship between the incidence of starvation in black skipjack larvae from individual net tows and the location and time of sampling (Margulies, 1993). The interaction of food patchiness with high water temperatures of the rainy season could also result in high but variable growth rates. At higher water temperatures, ingestion rates must increase in response to elevated metabolic rates (Houde, 1989). Thus, variable growth may result from the degree and intensity of feeding success when temperatures are high and prey organisms are patchy in distribution. Although there is an indication of more variable growth among older individuals of the rainy season, more information is necessary to examine the relevance of small-scale spatial patchiness of prey organisms and the interaction of temperature on the growth of larvae and early juveniles in the Panama Bight.

This study provides the first *in situ* description of growth of larval and early-juvenile scombrids in the eastern Pacific. The analysis of otolith microstructure indicates that increments are deposited at a daily rate in the sagittae of larval and early-juvenile black skipjack and that this ageing technique can be used to estimate growth rates. Seasonal differences in growth were not apparent for late-stage larval and early-juvenile black skipjack, but may have occurred during earlier larval stages as indicated by seasonal differences in otolith size relative to fish length. The disproportionately larger otoliths of fish sampled in the rainy season indicate that otolith and somatic growth should not be represented by a single, linear relationship and that more complex models should be applied in back-calculation procedures. Age determination using otolith microstructure and subsequent growth analyses are currently being applied to all early life stages and may provide important insights into the survival and recruitment dynamics of scombrids in the eastern Pacific.

ACKNOWLEDGEMENTS

The field and laboratory assistance of many Commission staff members at Achotines, especially by D. Ballesteros, A. Cano, E. Espinoza, R. Lauth, D. Margulies, M. Samaniego, D. Soliz, V. Scholey, and P. Vergara, is gratefully acknowledged. Throughout this study D. Margulies provided constant encouragement and helpful discussions of larval fish ecology. Preliminary immersion experiments were conducted by R. Lauth, D. Margulies, and V. Scholey. J. Butler, T. Foreman, and A. Wild provided guidance during the initial development of techniques and interpretation of otolith microstructure. T. Foreman assisted in the confirmation of daily increments. Many colleagues, especially D. DeMaster, T. Foreman, D. Margulies, R. Owen, K. Schaefer, P. Tomlinson, and A. Wild, provided helpful suggestions and insightful discussions. I wish to thank W. Bayliff, J. Butler, R. Deriso, D. Margulies, D. Secor, N. Webb, A. Wild, and M. Yoklavich for critical reviews of the manuscript and K. Reichardt and N. Webb for the Spanish translation. Finally, I would like to express my gratitude to the Commission's Director, J. Joseph, and the Chief Scientist of the Tuna-Billfish Program, R. Deriso, for their support of this research.

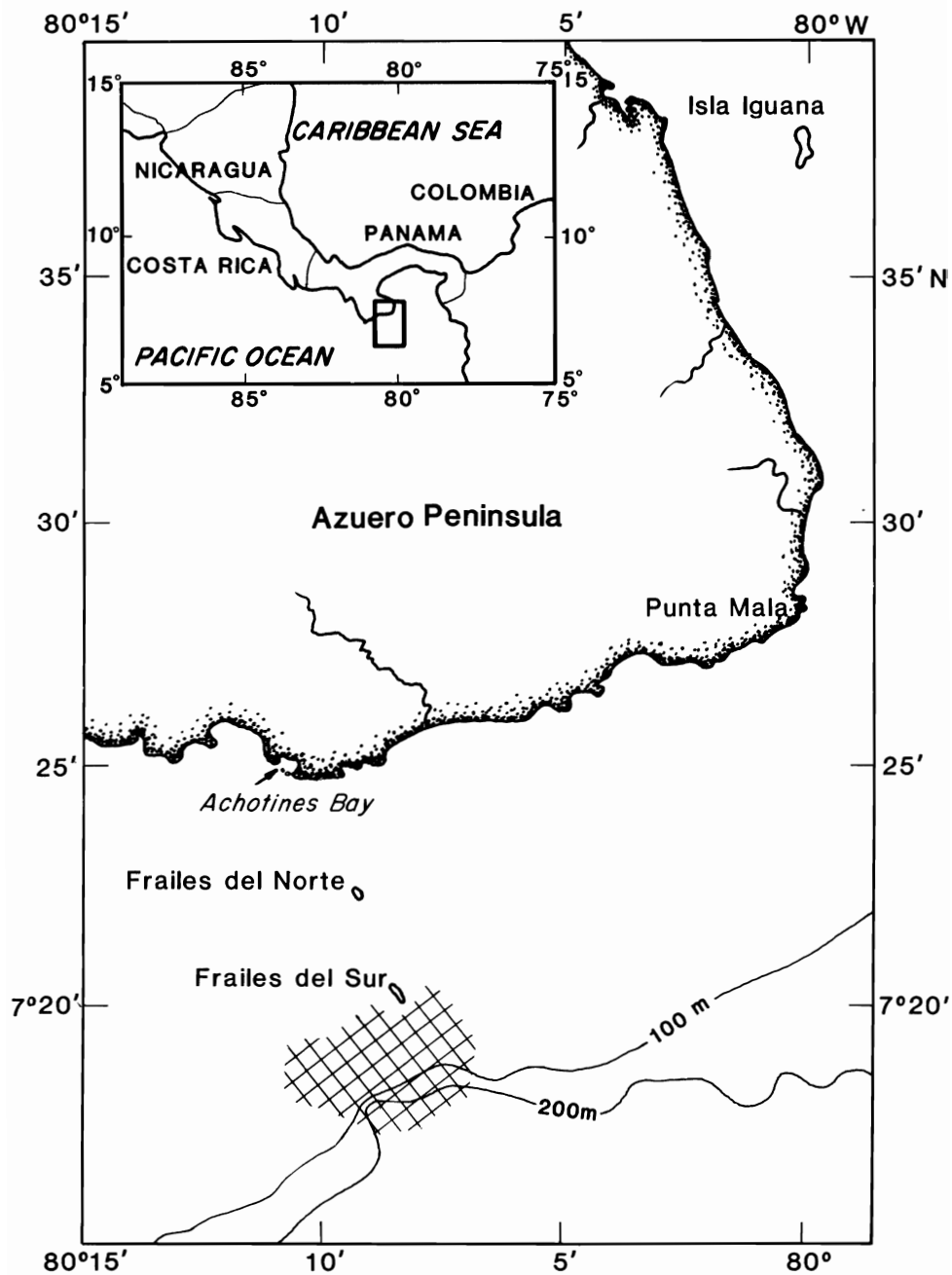


FIGURE 1. Location (cross-hatched) for nightlight collections of larval and early-juvenile black skipjack.

FIGURA 1. Ubicación (doblemente sombreada) de las capturas nocturnas de barriletes negros larvales y juveniles tempranos.

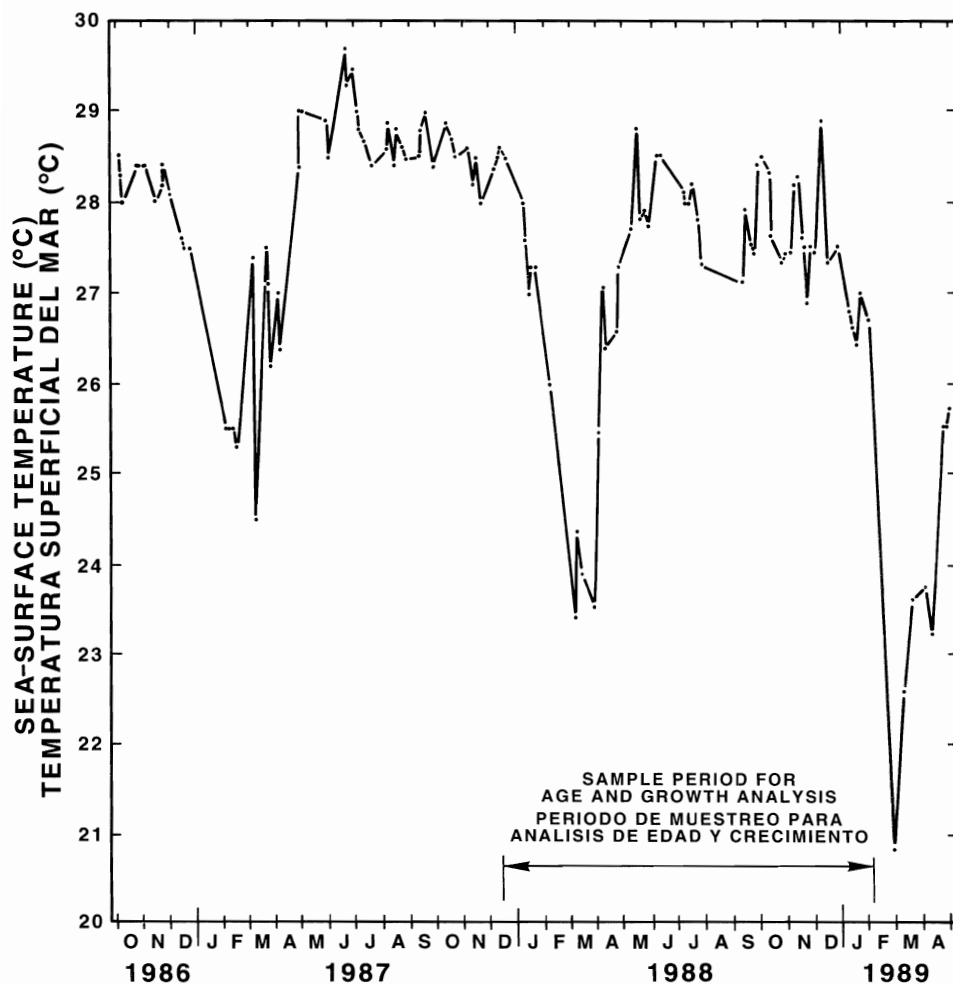


FIGURE 2. Sea-surface temperatures taken during nightlight collections of larval and early-juvenile black skipjack.

FIGURA 2. Temperaturas de la superficie del mar tomadas durante las capturas nocturnas de barriletes negros larvales y juveniles tempranos.

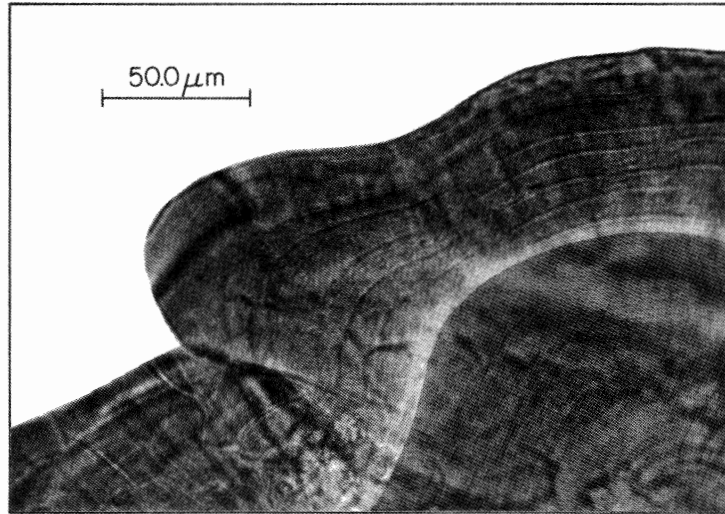


FIGURE 3. Photomicrograph of the anti-rostrum of a sagitta (120 \times) from an early-juvenile black skipjack immersed for 12 hours in 200 mg/L tetracycline hydrochloride. The sagitta is photographed with transmitted and ultraviolet light to show the fluorescent mark and the following seven increments corresponding to the number of days the fish was held beyond the immersion period.

FIGURA 3. Fotomicrográfico del anti-rostro de una ságita (120 \times) de un barrilete negro juvenil temprano sumergido por 12 horas en 200 mg/L de hidrócloro de tetraciclina. La ságita fue fotografiada con luz transmitida y ultravioleta para mostrar la marca fluorescente y los siete incrementos siguientes correspondientes al número de días que el pez fue retenido después del período de inmersión.

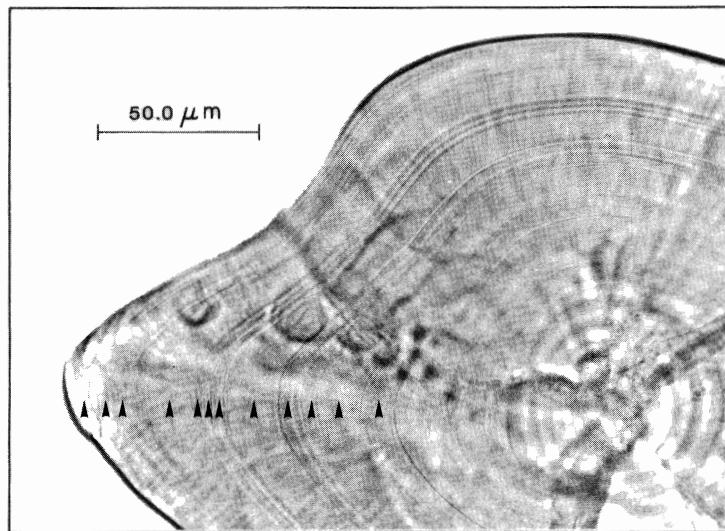


FIGURE 4. Photomicrograph (150 \times) of the rostrum of a sagitta from a 14.4 mm SL black skipjack with an estimated age of 22 days, showing the variable pattern of growth in the incremental zones (indicated by arrows) following the tenth increment.

FIGURA 4. Fotomicrográfico (150 \times) del rostro de una ságita de un barrilete negro de 14.4 mm TE y de edad estimada de 22 días, mostrando el crecimiento variable en las zonas incrementales (indicado por flechas) a partir del décimo incremento.

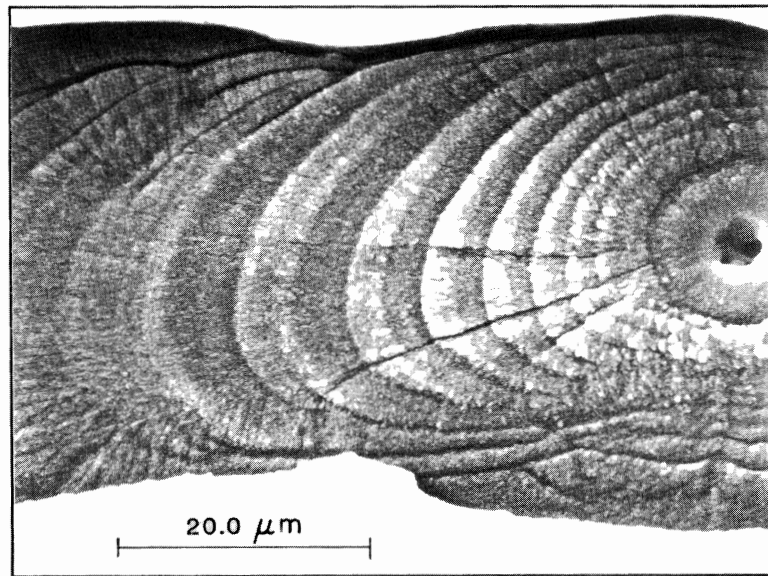


FIGURE 5. Scanning electron micrograph (1900 \times) of a frontal section of the postrostrum of a sagitta from a 12.5 mm-SL black skipjack. The first nine increments are shown.

FIGURA 5. Micrografo de barrido electrónico (1900 \times) de una sección frontal del post-rostrum de una ságita de un barrilete negro de 12.5 mm TE. Se ilustran los nueve primeros incrementos.

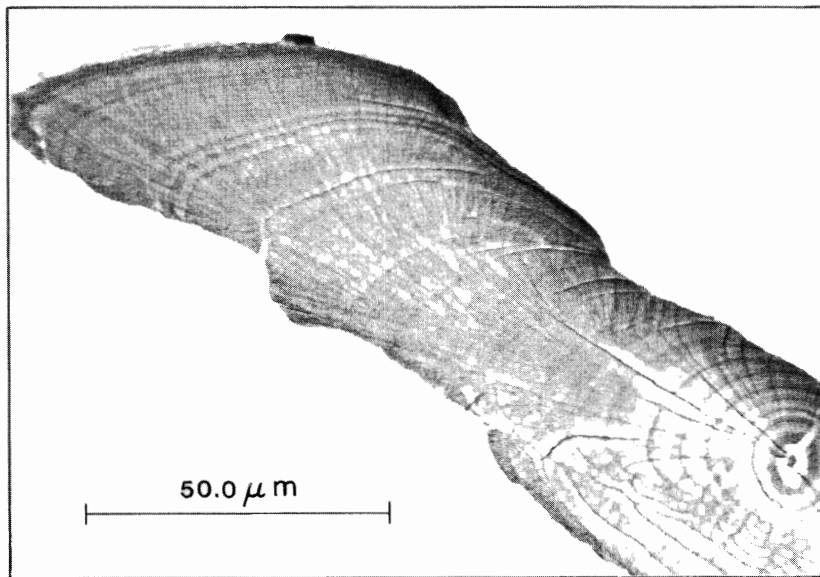


FIGURE 6. Scanning electron micrograph (840 \times) of a frontal section of the rostrum of a sagitta from the same specimen examined with light microscopy (Figure 4), showing a similar pattern of increment spacing.

FIGURA 6. Micrografo de barrido electrónico (840 \times) de una sección frontal del rostrum de una ságita del mismo espécimen examinado con microscopia de luz (Figura 4), mostrando una pauta similar de espacios entre incrementos.

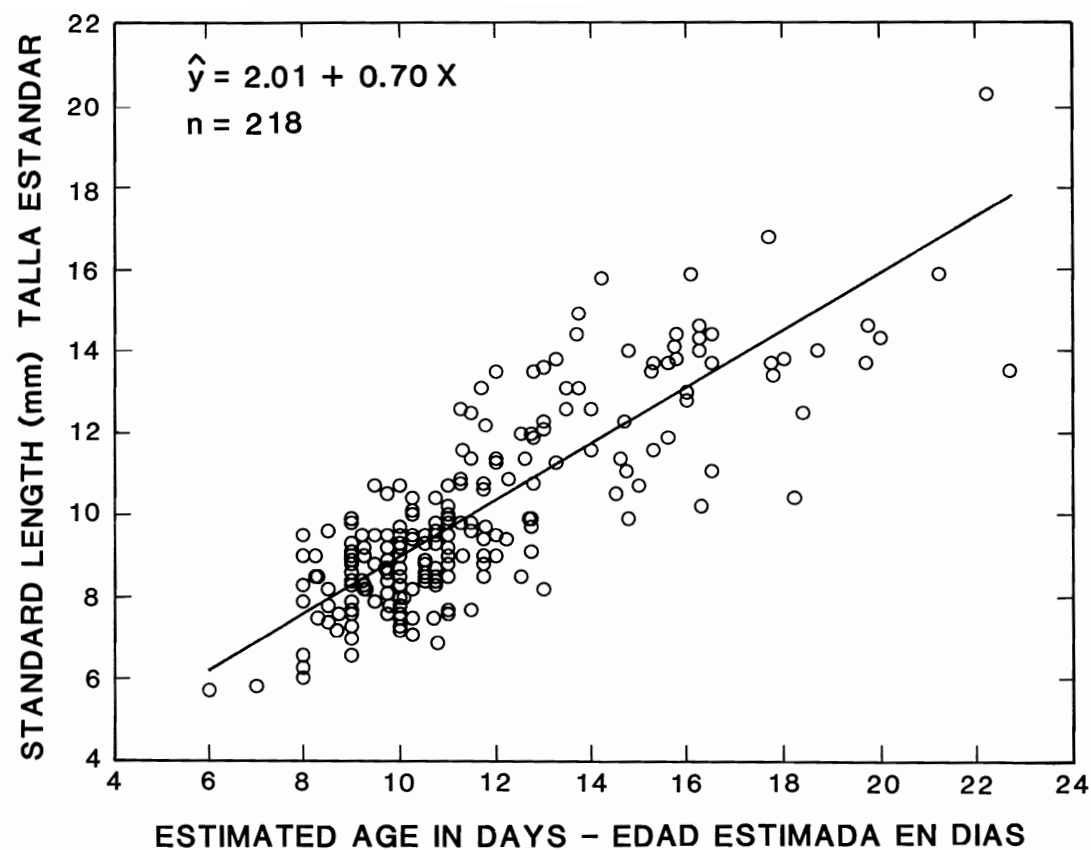


FIGURE 7. Relationship between standard length and age in days estimated from otolith (sagitta) increment counts of larval and early-juvenile black skipjack. The line was fitted to the data by weighted, least-squares regression.

FIGURA 7. Relación entre talla estándar y edad en días estimada a partir de conteos de incrementos en otolitos (ságitas) de barriletes negros larvales y juveniles tempranos. La línea fue ajustada a los datos con una regresión ponderada de cuadrados mínimos.

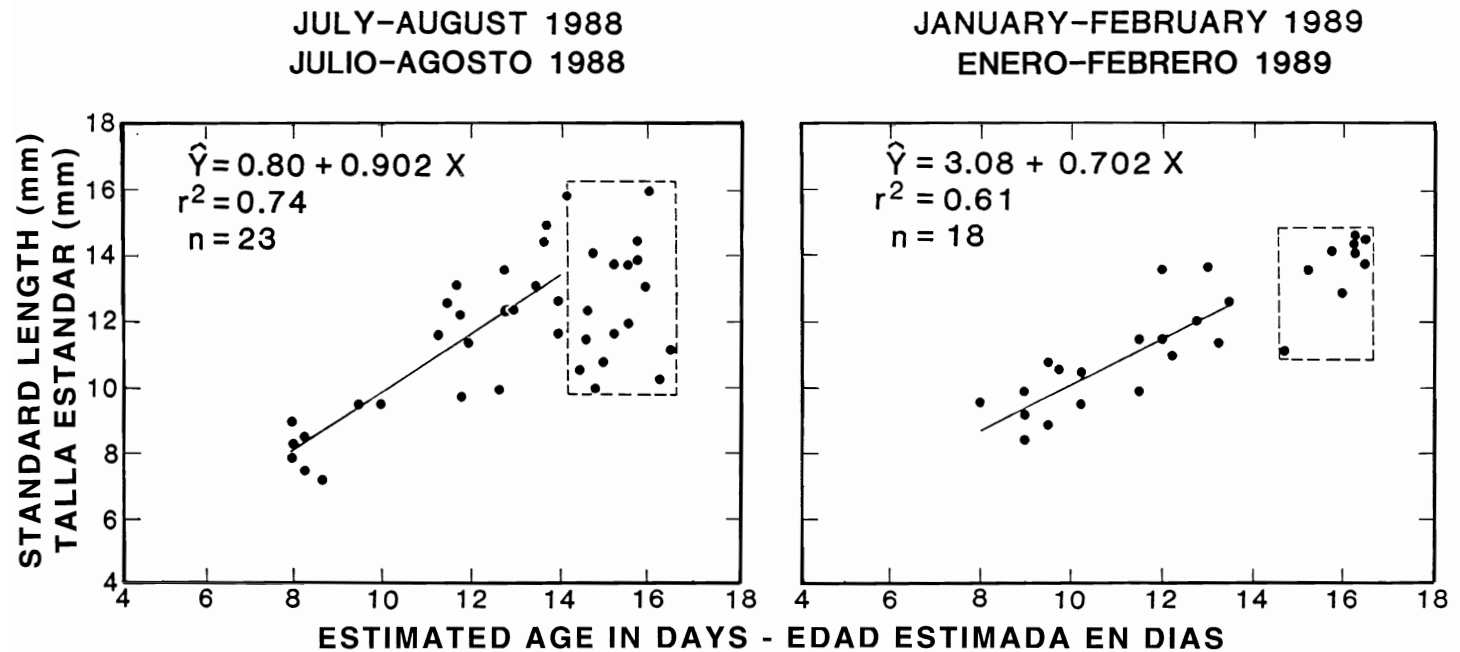


FIGURE 8. Length-age relationships of black skipjack 8-14 days of age collected during the rainy season (July-August 1988) and during the dry season (January-February 1989). The degree of variability of individuals older than 14 days is indicated by points within the dashed rectangles.

FIGURA 8. Relación talla-edad de barriletes negros de 8-14 días de edad capturados durante la temporada de lluvias (julio-agosto de 1988) y la temporada de sequía (enero-febrero de 1989). El grado de variabilidad de individuos de más de 14 días de edad es indicado por puntos dentro de los rectángulos de trazos.

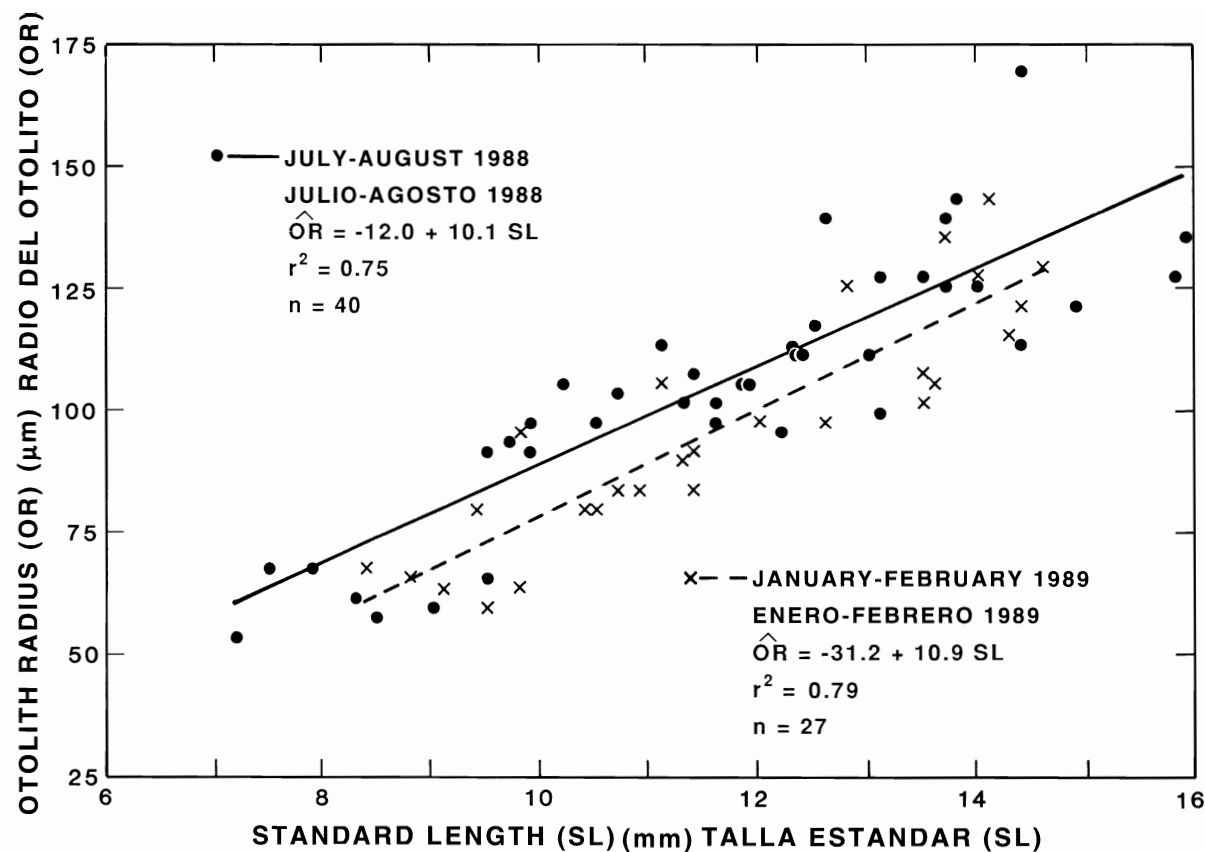


FIGURE 9. Linear regressions of otolith radius (OR) on standard length (SL) for black skipjack sampled during the rainy season (July-August 1988) and during the dry season (January-February 1989).

FIGURA 9. Regresiones lineales del radio del otolito (RO) sobre talla estándar (TE) para barriletes negros muestreados durante la temporada de lluvias (julio-agosto de 1988) y la temporada de sequía (enero-febrero de 1989).

TABLE 1. Collection information for larval and early-juvenile black skipjack.**TABLA 1.** Información de la captura de barriletes negros larvales y juveniles tempranos.

Collection date (month/year)	Average SST (SE) ¹ (°C)	Number of nights sampled	Number of fish collected	SL ² size range mean (SE)	Age ³ range mean (SE)	Number of fish used in SL-age analyses	Number of fish used in SL-OR ⁴ analysis
Fecha de captura (mes/año)	TSM media (EE) ¹ (C)	Número de noches muestreadas	Número de peces capturadas	Promedio (EE) del rango de talla TE ²	Promedio (EE) del rango de edad ³	Número de peces usados en aná- lisis de TE-edad	Número de peces usados en aná- lisis de TE-RO ⁴
12/87	28.5 (0.05)	2	14	6.9-9.5 8.0 (0.21)	9.0-12.2 10.0 (0.22)	14	13
01/88	27.3 (0.00)	1	3	9.5-11.9 10.9 (0.73)	8.0-12.8 11.1 (1.57)	3	3
03/88	24.4 (0.00)	1	1	10.8	12.8	1	1
07/88	27.9 (0.16) ⁵	6	52	7.5-20.3 12.9 (0.34)	8.0-22.7 15.2 (0.47)	47	50
08/88	No temp. data	1	6	7.2-11.6 9.0 (0.60)	8.0-15.3 9.6 (1.16)	6	6
09/88	27.9 (0.50)	2	3	8.4-9.7 9.1 (0.38)	10.5-12.8 11.3 (0.71)	3	3
10/88	27.4 (0.11)	3	54	5.8-10.9 8.6 (0.18)	6.0-12.8 10.1 (0.18)	54	52
11/88	27.8 (0.27)	3	5	12.0-13.8 12.7 (0.33)	11.3-13.8 12.7 (0.43)	5	5
12/88	27.9 (0.50)	3	61	7.3-10.7 8.9 (0.11)	8.0-13.0 10.2 (0.15)	58	58
01/89	26.8 (0.11)	3	15	8.4-14.6 12.1 (0.56)	9.0-16.5 13.2 (0.76)	15	15
02/89	26.7 (0.00)	1	12	9.1-14.1 11.8 (0.74)	8.0-16.5 11.1 (0.45)	12	12
TOTAL		24	226			218	218

¹ Monthly average sea-surface temperature and (standard error) for total nights sampled² Standard length (mm)³ Estimated age in days⁴ Otolith radius (μm)⁵ Temperature data for five of the six nights sampled¹ Temperatura de la superficie del mar media mensual y (error estándar) para todas las noches muestreadas² Talla estándar (mm)³ Edad estimada en días⁴ Radio del otolito (μm)⁵ Datos de temperatura de cinco de las seis noches muestreadas

TABLE 2. Summary of pooled survival data for postflexion larval and early-juvenile black skipjack immersed in 200 mg/L tetracycline hydrochloride.

TABLA 2. Resumen de datos de supervivencia agrupados para larvas en postflexión y juveniles tempranos de barrilete negro sumergidos en 200 mg/L de hidrócloro de tetraciclina.

Treatment	Number of fish	Live fish-days	Deaths	Average daily survival and (95% CI)
Tratamiento	Número de peces	Días-pep	Muertes	Supervivencia diaria media y (95% IC)
6 hours - 6 horas	18	114	2	0.983 (0.958-1.000)
12 hours - 12 horas	18	120	2	0.983 (0.960-1.000)
Control	18	109	4	0.963 (0.928-0.999)

TABLE 3. Number of growth increments deposited in the sagittae of postflexion larval and early-juvenile black skipjack after immersion in 200 mg/L tetracycline hydrochloride.

TABLA 3. Número de incrementos de crecimiento depositados en las ságitas de larvas en postflexión y juveniles tempranos de barrilete negro después de inmersión en 200 mg/L de hidrócloro de tetraciclina.

Treatment	Number of fish	Days since marking	Number of increments	
Tratamiento	Número de peces	Días después de marcar	Mean	Range
			Número de incrementos Promedio	Rango
6 hours - 6 horas	12	7	6.81	6.0 - 7.0
12 hours - 12 horas	15	7	6.85	6.0 - 7.0
Pooled - Agrupado	27	7	6.83	6.0 - 7.0

TABLE 4. Mean number of increments \pm (S.E.) and the difference between estimates from scanning electron microscope (SEM) and light microscope (LM) examinations.

TABLA 4. Número medio de incrementos \pm (E.E.) y la diferencia entre las estimaciones basados en exámenes con microscopio electrónico de barrida (MEB) y microscopio de luz (ML).

Specimen number	Number of times counted <i>n</i>	Mean number of increments		Difference
		SEM	LM	
Número del espécimen	Número de veces contado <i>n</i>	Número medio de incrementos		Diferencia
		MEB	ML	
1	3	16.70 (0.67)	16.70 (0.33)	0.00
2	3	19.00 (0.00)	19.70 (0.33)	−0.70
3	3	9.30 (0.33)	9.00 (0.00)	0.30
4	3	9.70 (0.33)	10.00 (0.58)	−0.30
5	4	13.75 (0.63)	13.75 (0.25)	0.00
6	3	14.30 (0.33)	14.70 (0.33)	−0.40
7	3	13.30 (0.33)	14.00 (0.00)	−0.70
8	4	22.25 (0.48)	20.00 (0.00)	2.25

**VALIDACION DE INCREMENTOS DE CRECIMIENTO DIARIOS
Y ESTIMACION DE TASAS DE CRECIMIENTO DE
LARVAS Y JUVENILES TEMPRANOS DE BARRILETE NEGRO,
EUTHYNNUS LINEATUS, USANDO OTOLITOS**

por

Jeanne B. Wexler

RESUMEN

Se examinaron incrementos en otolitos (ságitas), usando microscopia de luz y de barrido electrónico, a fin de determinar la edad y estimar las tasas de crecimiento de barriletes negros, *Euthynnus lineatus*, larvales y juveniles tempranos. Entre 1987 y 1989 se capturaron larvas y juveniles en las aguas costeras de Panamá en el Océano Pacífico oriental. Los resultados de un experimento de laboratorio indicaron que una inmersión de 6 a 12 horas de duración en una solución de 200 mg/L de hidrócloro de tetraciclina marca los otolitos adecuadamente y que los incrementos se forman a diario en las ságitas de larvas en postflexión y juveniles tempranos. Además, las tasas de supervivencia de los peces tratados con tetraciclina no fueron significativamente diferentes a aquellas de los peces de control. Se calcularon las tasas de crecimiento a partir de las relaciones de talla-edad de 218 especímenes de TE entre 5.7 y 20.3 mm capturados en el mar. Se estimó una tasa de crecimiento de 0.70 mm/día a partir de la regresión ponderada de talla estándar sobre edad para todos los especímenes. Esta tasa cae dentro del rango reportado para larvas y juveniles tempranos de otras especies de escómbridos subtropicales y tropicales. Las tasas de crecimiento de larvas en postflexión y juveniles tempranos no fueron significativamente diferentes entre la temporada de lluvias en julio-agosto de 1988 y la temporada de sequía y afloramiento en enero-febrero de 1989. Sin embargo, el crecimiento fue significativamente más variable para los individuos de mayor edad en julio-agosto que en enero-febrero, y quizás corresponda parcialmente a la irregularidad temporal de la abundancia de presas. Las tasas de crecimiento de los otolitos en relación a la talla de los peces tampoco fueron significativamente diferentes entre temporadas; sin embargo, los otolitos eran más grandes en relación a la talla en peces capturados en la temporada de lluvias, lo cual podría reflejar crecimiento más lento durante las etapas larvales más tempranas.

INTRODUCCION

Con frecuencia, los otolitos son las primeras estructuras calcificadas formadas durante el desarrollo temprano de peces teleósteos. A partir de un registro de la formación diaria de incrementos, se pueden usar los otolitos para determinar la edad y los parámetros de crecimiento de peces larvales y juveniles (Campana y Nielson, 1985). La caracterización del crecimiento durante las etapas tempranas del ciclo vital podría contribuir a la comprensión de la cohesión de cohortes, puesto que cambios pequeños en las tasas de crecimiento pueden afectar la duración de las etapas anteriores al reclutamiento y las tasas de mortalidad subsecuentes (Houde, 1987).

Establecer si los incrementos se forman diariamente es fundamental para la determinación de relaciones de crecimiento basadas en edades determinadas usando otolitos (Campana y Neilson, 1985; Jones, 1986). La confirmación de la formación diaria de incrementos y de una relación estrecha entre el crecimiento somático y de los otolitos haría posible retrocalcular tasas de crecimiento de individuos y proporcionaría información sobre aquellos procedimientos de reclutamiento que podrían ser específicos por talla (Campana y Neilson, 1985; Secor y Dean, 1992). Varios estudios (Kendall y Gordon, 1981; Brothers *et al.*, 1983; Collins *et al.*, 1988; De Vries *et al.*, 1990; Jenkins y Davis, 1990; Lang, 1991) incluyen descripciones de crecimiento basadas en edades determinadas a partir de análisis de los otolitos de escómbridos larvales y juveniles tempranos (familia Scombridae), pero solamente uno (Radtke, 1983) incluye una validación de la formación diaria de incrementos. Radtke

(1983) validó la deposición diaria de incrementos de crecimiento en los otolitos de larvas del atún barrilete, *Katsuwonus pelamis*, en etapas de vesícula vitelina y primera alimentación durante los cinco días después de su cría en el laboratorio. No se han confirmado tasas de deposición diaria en escómbridos larvales tardíos (es decir, en etapas de flexión y postflexión) y juveniles tempranos, pero sí se han aplicado métodos indirectos de validación al aleta azul del sur, *Thunnus maccoyii*, usando análisis de incrementos marginales (Jenkins y Davis, 1990) y a los carites lucio y Atlántico (*Scomberomorus cavalla* y *S. maculatus*), usando distribuciones de frecuencia de tallas observadas y retrocalculadas (De Vries *et al.*, 1990). (Las etapas de desarrollo (preflexión, flexión, y postflexión, y transicional, juvenil temprano) se basan en las etapas de desarrollo del notocordio y siguen la definición de Ahlstrom *et al.*, 1976.)

Tasas de crecimiento *in situ*, todas basadas en análisis de otolitos, han sido estimadas para las larvas y juveniles tempranos de solamente unas pocas especies subtropicales y tropicales de escómbridos que ocurren en los Océanos Atlántico (Collins, *et al.*, 1988; DeVries *et al.*, 1990; Lang, 1991) e Indico (Jenkins y Davis, 1990). No han sido reportadas tasas de crecimiento *in situ* para las etapas tempranas de vida de escómbridos en el Océano Pacífico oriental, pero sí han sido estimadas tasas de crecimiento en cautiverio para larvas y juveniles tempranos de barrilete negro, *Euthynnus lineatus* (Clemens, 1956; Olson y Scholey, 1990). Los escómbridos larvales y juveniles en mares cálidos son capaces de crecimiento rápido y tasas de ingestión elevadas (Houde, 1989), pero pueden también demostrar crecimiento muy variable debido a la competencia y disponibilidad de alimento (Jenkins *et al.*, 1991). Tasas de crecimiento reportadas han fluctuado entre 0.32 y 0.47 mm/d para larvas (en reflexión y postflexión) del carite lucio (Collins *et al.*, 1988), aleta azul del sur (Jenkins y Davis, 1990), y aleta amarilla (Lang, 1991), y entre 0.89 y 1.15 mm/d para larvas (en flexión y postflexión) y juveniles tempranos de los carites lucio y del Atlántico (DeVries *et al.*, 1990).

En este estudio, se estimaron la edad y el crecimiento de barriletes negros larvales (en flexión y postflexión) y juveniles tempranos, capturados frente al litoral Pacífico de Panamá, a partir de la microestructura de los otolitos. El barrilete negro es una especie nerítica y oceánica de la tribu Thunnini (atunes puros verdaderos) que ocurre en las aguas subtropicales y tropicales del Océano Pacífico oriental y a veces cerca de las Islas de Hawaii (Collette y Nauen, 1983). Aunque la especie es de poca importancia comercial, es posible que su dinámica de crecimiento durante la vida temprana sea comparable a aquella de otros atunes tropicales. Las larvas y juveniles del barrilete negro se encuentran con frecuencia en las aguas neríticas y tropicales del Océano Pacífico oriental (Klawe, 1963; Klawe *et al.*, 1970; Moser *et al.*, 1974; Olvera *et al.*, 1990; Anónimo, 1992), y con menor frecuencia en ambientes oceánicos (Calkins y Klawe, 1963; Yoshida, 1979; Nishikawa *et al.*, 1985). Los atunes barrilete negro son desovadores múltiples que exhiben períodos geográficamente distintos de desove prolongado en aguas costeras y de alta mar desde México hasta el Golfo de Panamá (Schaefer, 1987). En el Golfo de Panamá, el desove ocurre en la mayor parte del año durante fluctuaciones temporales de precipitación y afloramiento costero; sin embargo, el desove máximo ocurre durante el período de afloramiento costero entre enero y marzo (Schaefer, 1987), cuando los niveles de productividad primaria y secundaria son más altos (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969). Se ignora el efecto temporal del afloramiento costero y la disponibilidad de alimento sobre el crecimiento de escómbridos en las etapas tempranas de vida en el Golfo de Panamá, y este efecto podría afectar el éxito de alimentación y la supervivencia de forma importante durante las etapas anteriores al reclutamiento. La presencia de barriletes negros larvales y juveniles tempranos durante la mayor parte del año en el Golfo de Panamá facilita una comparación del crecimiento entre una temporada de afloramiento costero marcado y una de afloramiento reducido y productividad más baja.

El objetivo de este estudio fue utilizar las ságitas (la más grande de las tres parejas de otolitos) de barriletes negros larvales y juveniles tempranos capturados en el Golfo de Panamá para:

1) determinar si los incrementos son formados diariamente y la metodología apropiada para marcar los otolitos y minimizar la mortalidad de los peces; 2) estimar una tasa de crecimiento media a partir de los datos de talla-edad; y 3) evaluar la influencia temporal del afloramiento costero y disponibilidad de alimento sobre el crecimiento somático y de los otolitos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Colección de larvas y juveniles tempranos

Los especímenes fueron capturados en la parte noroeste del Golfo de Panamá, cerca del Laboratorio de Achotines de la Comisión Interamericana del Atún Tropical (CIAT), situado en la Península de Azuero de la República de Panamá (Fig. 1). Son características del área del Golfo de Panamá dos temporadas (Forsbergh, 1963, 1969; Anónimo, 1992). La temporada de sequía, que dura de diciembre a abril, es caracterizada por poca lluvia, temperaturas superficiales del mar más bajas (Fig. 2), y afloramiento costero marcado asociado con vientos del norte. Durante la temporada de lluvias (de mayo a noviembre), ocurren típicamente mucha precipitación, temperaturas superficiales del mar más elevadas (Fig. 2), y condiciones de afloramiento reducidas.

Se capturaron barriletes negros entre diciembre de 1987 y febrero de 1989 (Tabla 1) para los análisis de crecimiento, y durante julio y agosto de 1990 para los experimentos de laboratorio. Fueron capturados a unas 3.5-6.5 mn de la Bahía de Achotines cerca de los isóbatos de 100- y 200-m (Fig. 1). Se registró la temperatura superficial del mar durante el muestreo (Fig. 2; Tabla 1). Los peces fueron atraídos a una luz submarina (24 voltios DC, 300 vatios) de noche y capturados con un salabardo. La luz fue suspendida a una profundidad de unos 15 m durante unos 5 a 10 minutos, y entonces alzada a unos 1 ó 2 m bajo la superficie, donde se capturaron los peces. Los peces fueron conservados inmediatamente en etanol al 95% neutralizado con TRIS (tris[hidroximetilo]-aminometano). El neutralizador TRIS mantiene un pH neutro en etanol e impide la degradación de otolitos almacenados durante períodos extendidos (J. Butler, National Marine Fisheries Service, com. pers.). Los peces capturados para ser trasladados vivos al laboratorio fueron cargados en bolsas plásticas (capacidad 40 L) con agua de mar oxigenada y un acondicionador de agua que restituye la capa mucosa natural perdida durante la captura y el traslado al laboratorio. Se usaron los peces que sobrevivieron el traslado para experimentos de laboratorio, mientras que los que murieron al llegar al laboratorio (es decir, que murieron menos de una hora antes de ser conservados sin ningún indicio aparente de degradación de tejido) fueron también conservados en etanol neutro y usados en los análisis de crecimiento y determinación de edad. Al cabo de 24 horas, el etanol fue reemplazado. Antes de extraer los otolitos, los especímenes conservados fueron colocados en agua destilada para ablandar el cuerpo y facilitar la medición. Se midió la talla estándar (TE) al 0.1 mm más cercano, usando un microscopio de disección y un micrómetro ocular. La TE no fue ajustada por contracción causada por la conservación; sin embargo, un análisis preliminar indica que la contracción es menos de 5% en larvas en postflexión y juveniles tempranos conservados en etanol neutro al 95%. Cualquier contracción de la talla del pez que pudiera haber ocurrido entre que murió y que fue fijado en etanol (Jennings, 1991) fue probablemente mínima, puesto que los esqueletos de los especímenes capturados para este estudio se estaban osificando, un proceso asociado con la metamorfosis. Estudios pasados indican que este tipo de contracción disminuye con la edad y el desarrollo de estructuras osificadas (Theilacker, 1980; Radtke, 1989; Jennings, 1991).

Preparación de los otolitos y procedimientos

Las ságitas de cada espécimen fueron extraídas, limpiadas en hipoclorito de sodio (blanquimiento) y agua destilada, y montadas para la microscopía en medio de montaje EUKITT, con

la cara distal hacia arriba. Limpiar los otolitos en blanquimiento no causó erosión, e hizo más clara la imagen de los incrementos. Se pulió la superficie de cada ságita antes de contar los incrementos con un microscopio de luz (ML) a aumentos de entre 720 y 1200 \times . Se usaron los criterios para distinguir los incrementos subdiarios de los diarios en atunes aleta amarilla adultos (Wild, 1986) para identificar y contar los incrementos en este estudio. El número de incrementos en el rostro (la proyección más anterior de la ságita) no fue significativamente diferente de aquel en el postrostro (la proyección más posterior de la ságita) ($n = 20$; prueba t , $t_{0.05(2),19} = 1.08$, $P > 0.20$). Por lo tanto, un lector hizo entre tres y ocho conteos independientes (es decir, contó cada muestra entre 3 y 8 veces sin conocimiento previo de los conteos anteriores) desde el núcleo hasta el borde externo de una de las proyecciones en ambas ságitas de todos los especímenes. Para cada pareja, el número medio de incrementos en la ságita más claramente legible (y que normalmente resultó en un conteo medio de incrementos más elevado) fue usado como estimación directa de la edad en días. Cuatro de los especímenes fueron rechazados porque el coeficiente de variación de los conteos replicados en cualquiera de las dos ságitas fue mayor al criterio de precisión de 5%. Se midió el radio de las ságitas desde el centro del primordio (el punto inicial de crecimiento dentro del núcleo del otolito) hasta el borde externo del rostro y postrostro, usando un micrómetro ocular. Se utilizó el radio del rostro para examinar las relaciones entre el crecimiento somático y de los otolitos, puesto que el radio del postrostro no rindió una relación lineal sencilla con la talla del pez. No fue posible medir los radios de las ságitas en cuatro especímenes debido a daños ocurridos durante la preparación.

A fin de verificar los conteos hechos con el ML, las ságitas de una submuestra de ocho peces fueron preparadas para examen bajo un microscopio electrónico de barrida (MEB). Antes de preparar el otolito para el MEB, se determinaron la trayectoria de conteo y el promedio de 3 ó 4 conteos independientes de incrementos en la superficie distal de una ságita de cada pareja, usando el ML. Cada ságita fue incrustada en un molde de resina Castolite. Se cortó el molde de resina seca paralelo a los bordes ventral y dorsal del otolito, y los otolitos fueron lijados y pulidos en un plano frontal usando papel abrasivo de 600, 30, y 0.3 μm , seguido por polvo de alúmina de 0.05 μm . Las ságitas fueron tratadas con 0.05 N HCl por 5-7 segundos, seguido por enjuagues en agua destilada, blanquimiento, y otra vez agua destilada. El enjuague de blanquimiento desaloja la materia orgánica en la zona discontinua, creando muescas entre las zonas incrementales (Watabe *et al.*, 1982). A continuación las ságitas fueron montadas sobre tacos de MEB, revestidas de oro, y fotografiadas a ampliaciones de 1500-7000 \times , usando un MEB de Cambridge. Se hicieron tres o cuatro conteos independientes de los incrementos en cada ságita seccionada a partir de los micrógrafos del MEB y se compararon los conteos promediados con aquellos del ML. En tres de los especímenes fue más difícil interpretar los incrementos contados de los micrógrafos del MEB que aquellos vistos con el LM. Por lo tanto, se aceptaron conteos replicados con un coeficiente de variación de 7% o menos para la comparación de las dos técnicas.

Validación de los incrementos diarios de crecimiento

En agosto de 1990 se realizó en el Laboratorio de Achotines un experimento de inmersión usando hidrócloro de tetraciclina (THCL), a fin de comprobar la hipótesis de que los incrementos se forman a diario en las ságitas de barriletes negros larvales y juveniles tempranos. El experimento fue diseñado además para determinar una concentración y un período de exposición eficaz que marcaría las ságitas y minimizaría la mortalidad de peces. La concentración de THCL y los períodos de exposición seleccionados para este experimento fueron basados en los resultados de investigaciones preliminares realizadas por miembros del personal de la CIAT. (Calceína fue comprobada también como marcador temporal en los otolitos de barriletes negros larvales y juveniles tempranos en julio de 1990 (Anónimo, 1992). Sin embargo, se consideran preliminares los resultados, ya que no

se habían refinado las técnicas de tratamiento, y por lo tanto no se presentan en este informe).

Inmediatamente después de llegar al laboratorio, los barriletes negros fueron colocados en estanques de 1.5 m de diámetro con 571 L de agua de mar oxigenada y filtrada. Al cabo de un período de aclimatación, individuos de talla similar fueron capturados al azar y trasladados a una solución anestésica de 100 mg/L de MS 222 (méтаносульфonato de tricaina) por aproximadamente 20 segundos. Se midió la TE al 0.1 mm más cercano con calibradores, y a continuación los individuos fueron asignados al azar a estanques de 1.2 m de diámetro, con 303 L de agua de mar filtrada y oxigenada.

Durante los períodos de aclimatación y experimentales, todos los peces fueron alimentados con plancton salvaje (principalmente copépodos) clasificados por tamaño entre 333 y 1000 μm y a concentraciones de 50-100 organismos/L. La clasificación por tamaño fue basada en las anchuras de presas seleccionadas por larvas de postflexión de la caballa del Pacífico, *Scomber japonicus* (Hunter, 1981). Las concentraciones de alimento usadas fueron típicas de densidades entre moderadas y altas de copepoditos y nauplios de copépodos ocurriendo en sistemas costeros de afloramiento (Houde, 1978). Se mantuvieron concentraciones nominales de alimento en cada estanque calculando el promedio de dos alicuotas de 200 mL tomadas 3-4 veces por día.

Se controlaron diariamente la calidad, temperatura, y salinidad del agua y el nivel de luz en todos los estanques. A fin de reducir la acumulación de metabolitos, se reemplazó entre 25 y 50% del agua dos veces por día. El nivel diario de amoníaco siempre fue menos que 0.1 mg/L. El agua fue bombeada desde la Bahía de Achotines a una cisterna y avanzada por gravedad a través de filtros de cartucho de 5 y 1 μm a estanques de laboratorio. Este sistema de suministro de agua permitió cierta fluctuación diaria de temperatura. La temperatura del agua, registrada tres veces por día a las 0600, 1200, y 1800 horas, fluctuó entre 24.3 y 27.7°C durante el experimento. El nivel de salinidad fluctuó entre 31 y 33‰. Todos los peces fueron expuestos a un ciclo diario de luz (13 h de luz: 11 h de oscuridad); la luz natural indirecta fue suplementada con luz fluorescente sobre todos los estanques y midió entre 1000 y 2100 lux en la superficie del agua.

Al cabo de un período de aclimatación de 36-72 horas, se colocaron nueve barriletes negros en cada uno de seis estanques (un grupo de control, dos grupos de tratamiento; cada grupo con dos replicados). Se permitió a los peces aclimatarse por 24 horas adicionales antes de la inmersión en la solución de THCL. Para cada uno de los dos grupos de tratamiento, el THCL fue mezclado en un depósito con 100 L de agua de mar y sifoneado a dos estanques replicados simultáneamente, produciendo una concentración final de 200 mg/L. Todos los tratamientos de THCL fueron realizados de noche (entre las 1800 y 0730 horas) ya que exponer THCL a luz ambiental puede afectar adversamente las características fluorescentes de la tetraciclina (Weber y Ridgway, 1967; Lorson y Mudrak, 1987). Los períodos de inmersión de los dos grupos de tratamiento fueron de 6 (1800-0000 h) y 12 horas (1920-0720 h), respectivamente. Se trataron a los peces en los estanques de control de la misma manera que aquellos en los estanques de tratamiento de 12 horas, pero no se añadió THCL. Después de cada período de inmersión, se reemplazó el agua completamente en todos los estanques de control y de tratamiento. Se mantuvieron los peces de la forma descrita previamente durante los siete días del experimento.

Al cabo de siete días, los peces fueron medidos y conservados en etanol neutro al 95%. Las ságitas fueron preparadas de la forma arriba descrita y examinadas a 480 \times usando un LM de epifluorescencia. Se identificaron las marcas de THCL en los otolitos usando luz ultravioleta de una lámpara de mercurio de 200 vatios. La longitud de la onda de excitación fue limitada por una combinación de filtros de BG-12 y V (455 nm), y la autofluorescencia fue minimizada con un filtro de barrera de 530 nm.

Se contó tres veces el número de incrementos después de la marca de THCL en cada ságita, y se usó el promedio de los tres conteos para determinar la tasa de formación de los incrementos.

Se comparó el valor medio de los incrementos contados entre tratamientos y al valor esperado de siete incrementos (= días después de inmersión). Se verificaron los conteos comparando los conteos medios con aquellos de un segundo lector de mucha experiencia (T.J. Foreman, CIAT), quien no tenía ningún conocimiento previo del material de edad conocida.

A fin de determinar cuál tratamiento de THCL minimiza la mortalidad, la tasa diaria de supervivencia (TDS) fue calculada para peces tratados y controles con la ecuación siguiente (DeMaster y Drevenak, 1990):

$$TDS = 1 - \frac{\sum_{i=1}^k (y_i)}{\sum_{i=1}^k (x_i)}$$

donde

TDS = tasa media diaria de supervivencia;

y_i = 1 si el i -ésimo individuo murió durante el período experimental, y 0 si el i -ésimo individuo sobrevivió el experimento;

x_i = número de días que sobrevivió el i -ésimo individuo ("días-pezuña"), incluyendo el día de la muerte; y

k = número de peces en el grupo de tratamiento o control.

Se ajustaron las TDS para el canibalismo que ocurrió en dos de los estanques después del quinto día del experimento. Se supuso, con base en las altas tasas de supervivencia de los otros estanques, que los peces atacados hubieran sobrevivido el experimento entero. El intervalo de confianza de 95% para la TDS fue calculado directamente a partir de una distribución binomial (DeMaster y Drevenak, 1990). Las diferencias entre las TDS dentro de y entre los grupos de tratamiento y de control fueron comprobadas con la prueba de varianza de homogeneidad de la distribución binomial (Snedecor y Cochran, 1967). Las TDS para las réplicas fueron agrupadas si no se diferenciaron significativamente al nivel de 5%.

La intensidad de la marca de fluorocromo en cada otolito fue clasificada subjetivamente de buena o excelente a fin de determinar si la intensidad de las marcas era independiente de los efectos del tratamiento. Se comprobaron las similitudes en la proporción de marcas buenas entre réplicas usando la prueba exacta de Fisher (Siegel, 1956). Las intensidades de las marcas de cada réplica fueron agrupadas si eran similares, y se usó un análisis de ji cuadrado (Zar, 1984) para determinar si los distintos tratamientos afectaron la intensidad de la marca.

RESULTADOS

Validación de edad

Las tallas estándar iniciales y finales de los barriletes negros en el experimento fueron de 12.6 a 16.9 mm y de 21.1 a 39.6 mm, respectivamente. Las tallas medias iniciales y finales no fueron significativamente diferentes entre los estanques (análisis de varianza, $F_{(0.05,2)} = 1.36$, $P > 0.20$ y $F_{(0.05,2)} = 1.05$, $P > 0.20$, respectivamente). Durante los 7 días del experimento, las TDS agrupadas fueron elevadas (> 0.96) (Tabla 2) y no fueron significativamente diferentes entre los grupos de 6 horas, 12 horas, y control ($\chi^2_{0.05,2} = 1.25$, $0.50 < P < 0.75$). Ambos tratamientos de THCL produjeron marcas buenas en las ságitas de todos los peces examinados (Fig. 3). La proporción de marcas buenas fue igual para las réplicas en los tratamientos de 6 y 12 horas (prueba exacta de Fisher, $P = 0.333$ y $P = 1.000$, respectivamente). Sin embargo, la intensidad de las marcas fue proporcional a la duración de la inmersión en THCL ($\chi^2_{0.05,2} = 15.0$, $P < 0.001$). Ambos tratamientos produjeron marcas

buenas, pero el de 12 horas resultó en marcas más notorias. La ubicación de la marca de THCL correspondió al momento de la formación del incremento dentro de un período de 24 horas. La mayoría de las marcas estuvieron concentradas en el medio (tratamiento de 6 horas) o en la mitad exterior (tratamiento de 12 horas) de la zona incremental.

Los resultados del experimento de THCL apoyan la hipótesis de la deposición diaria de incrementos. El número medio de incrementos no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos de 6 y 12 horas (Tabla 3) ($t_{0.05(2),25} = 0.39$, $P > 0.60$), y el número medio agrupado no fue significativamente diferente al valor esperado de 7 incrementos ($t_{0.05(2),26} = 0.298$, $P > 0.50$) (Fig. 3; Tabla 3). La correlación fuerte entre los lectores apoyó la verificación de los conteos diarios de los incrementos. La verificación de incrementos diarios fue apoyada por la estrecha similitud de los conteos de los dos lectores; la diferencia media entre los conteos de cada lector no fue significativa (prueba de t de muestras emparejadas, $t_{0.05(2),26} = 1.13$, $(0.20 < P < 0.50)$).

Crecimiento y edad in situ

Típicamente, los nueve primeros incrementos en las ságitas de especímenes conservados en agua de mar estaban bien definidos, pero a partir del noveno se hicieron difíciles de diferenciar de los incrementos subdiarios. La anchura de las zonas incrementales aumentó paulatinamente entre el primer y el noveno incremento. En la mayoría de los otolitos, la anchura de los incrementos empezó a ser más variable entre los incrementos 9 y 23. A varios intervalos, entre 1 y 3 zonas incrementales estrechas fueron seguidas por una más ancha (Fig. 4). La zona incremental más estrecha midió 1.5 μm , bien superior a los límites de resolución (0.20-0.25 μm) del ML usado (Eastman Kodak Co., 1980; Campana *et al.*, 1987).

Los conteos de incrementos obtenidos con el MEB confirmaron aquellos logrados con el ML. Las zonas discontinuas aparecieron como muescas estrechas, discernibles de las zonas incrementales (Fig. 5). El número medio de incrementos contados con el MEB y con el ML (Tabla 4) no fueron estadísticamente diferentes (prueba de Wilcoxon de muestras emparejadas, $T_{+(0.05,8)} = 13.5$, $T_{-(0.05,8)} = 21.5$, $P > 0.50$; prueba de t de muestras emparejadas, $t_{0.05(2),7} = 0.17$, $P > 0.50$). La misma pauta de anchura de incrementos en otolitos enteros observada con el ML (Fig. 4) también fue aparente en las preparaciones del MEB (Fig. 6).

En total se capturaron 226 barriletes negros larvales y juveniles tempranos para los análisis de edad y crecimiento (Tabla 1). Las temperaturas medias de la superficie del mar registradas durante la colección de los especímenes fluctuaron entre 24.4 y 28.5°C (Fig. 2; Tabla 1). Las TE, medidas en 222 especímenes, variaron de 5.7 a 20.3 mm. Predominaron las larvas de postflexión de entre 8 y 10 mm (moda = 9.5 mm; promedio = 10.1 mm). Se contaron los incrementos en las ságitas de 222 peces y se estimó que eran de entre 6 y 23 días de edad (moda = 10.0 días; promedio = 11.6 días), con base en la tasa validada de un incremento de crecimiento por día.

Se describió el crecimiento del barrilete negro a partir de los datos de talla-edad de especímenes dentro del rango entero de 5.7-20.3 mm TE (Fig. 7; Tabla 1). Una inspección de los residuales de los datos ajustados por una regresión lineal no ponderada indicó que las observaciones tenían varianzas desiguales. Se comprobó la homogeneidad mediante la clasificación de los datos en siete intervalos de edad con varianzas en TE aproximadamente similares y números iguales de observaciones. Las varianzas fueron heterogéneas entre los siete grupos (prueba de Bartlett, $\chi^2_{0.05,6} = 69.64$, $P 0.001$). Se aplicó por lo tanto una regresión ponderada a los datos de talla-edad (Fig. 7). Para cada uno de los siete grupos, la inversa de la varianza (es decir, el error de los cuadrados medios) (w) y la edad promedio en días (\bar{X}) fueron ajustadas por el modelo exponencial

$$\hat{w} = 1.56e^{-0.165 \bar{X}}$$

$$(n = 7; r^2 = 0.80).$$

Se usaron los valores de \hat{w} como ponderaciones en la regresión de TE sobre edad en días. Se describe la relación con la ecuación

$$SL = 2.01 + 0.70AGE$$

$$(n = 218).$$

No había falta de ajuste significativa en este modelo lineal a partir de tallas repetidas a edades de entre 7 y 17 días ($F_{0.05(2),72,144} = 1.32$, $0.10 < P < 0.20$) (Draper y Smith, 1981). El estrecho rango de edad examinado y la varianza grande y ascendiente en la talla-a-edad dificultan la determinación de la forma de la trayectoria de crecimiento (Fig. 7). Los datos no se ajustaron a otros modelos de crecimiento mejor que al modelo lineal (coeficientes de determinación ajustados por grados de libertad: lineal, logarítmico, Gompertz, von Bertalanffy, $r_2 = 0.68$; función de potencia, $r_2 = 0.67$; exponencial, $r_2 = 0.65$). Es posible que el crecimiento disminuya a partir de los 17 días de edad, pero la muestra es demasiado pequeña para determinar si esto se debe a una disminución real o un artefacto del muestreo. La disminución aparente quizás afecte la pendiente de la regresión mediante la subestimación de la tasa de crecimiento. Sin embargo, un modelo de regresión ponderado aplicado a los datos de peces de entre 6 y 14 días de edad indicó solamente un leve aumento en la tasa de crecimiento, a unos 0.74 mm/día (± 0.06 DE). Por lo tanto, no parece que los peces más jóvenes crezcan significativamente más rápidamente que aquellos de más de 14 días de edad. El modelo lineal ajustado al conjunto entero de datos proporciona por lo tanto la mejor estimación de la tasa de crecimiento media, 0.70 mm/día (± 0.04 DE), para barriletes negros en el rango de tallas indicado.

Se compararon las relaciones lineales de los datos de talla-edad y tamaño del otolito-talla del pez de barriletes negros de entre 8.0 y 16.5 días de edad, capturados en julio y agosto, durante la temporada de lluvias, y en enero y febrero, durante la temporada de sequía (afloramiento). Este rango de edad permitió la inclusión de todos los especímenes de la temporada de sequía. Sin embargo, no fue posible comparar las regresiones lineales para los datos de talla-edad con análisis de covarianza (ANCOVA) puesto que sus varianzas no fueron homogéneas ($P < 0.005$) (Fig. 8). En el caso de la temporada de lluvias, la varianza fue significativamente mayor ($P < 0.02$) para los peces de más de 14 días de edad. Para los peces de entre 8 y 14 días de edad, empero, las varianzas fueron homogéneas para las dos temporadas ($P > 0.20$), y por lo tanto se ajustaron regresiones lineales a los dos subconjuntos truncados de datos (Fig. 8). Aunque la tasa de crecimiento fue mayor durante la temporada de lluvias (0.90 ± 0.11 mm/día) que durante la temporada de sequía (0.70 ± 0.13 mm/día), la diferencia entre los coeficientes de regresión no fue significativa (ANCOVA $F_{0.05(1),1,37} = 1.18$, $P > 0.20$). El coeficiente de regresión común y la tasa de crecimiento fueron 0.84 mm/día. La tasa de crecimiento de los otolitos en la talla del radio en relación al crecimiento somático de los peces en talla estándar tampoco fue significativamente diferente entre temporadas (ANCOVA, $F_{0.05(1),1,63} = 0.34$, $P > 0.50$) (Fig. 9). Sin embargo, una prueba de igualdad de los medios ajustados sí fue significativa (ANCOVA, $F_{0.05(1),1,63} = 9.07$, $P < 0.005$) e indicó que los peces muestreados en la temporada de lluvias tenían otolitos relativamente más grandes que aquellos en la temporada de sequía. El error estándar de estimación para cada regresión fue 12.9 y 10.8 para los datos de las temporadas de lluvia y de sequía, respectivamente.

DISCUSION

Microestructura de los otolitos

La microestructura de las ságitas del barrilete negro es similar a aquella de otros escómbridos (Brothers *et al.*, 1983; De Vries *et al.*, 1990; Jenkins y Davis, 1990) aunque son evidentes ciertas diferencias. Brothers *et al.* (1983) y Radtke (1983) informaron que dos capas ópticamente espesas rodean el primordio en las ságitas de larvas de atunes aleta azul Atlántico (*Thunnus thynnus*) y barrilete. Esto no fue observado por Jenkins y Davis (1990) en el aleta azul del sur ni tampoco en el barrilete negro en este estudio. Durante aproximadamente los nueve primeros días de desarrollo del barrilete negro, los incrementos en las ságitas fueron bien definidos y las zonas incrementales aumentaron paulatinamente a partir del primer incremento. A continuación los incrementos empezaron a ser menos notorios y ocurrieron a intervalos subdiarios en los individuos de mayor edad en el período de transición entre las etapas de postflexión larval y juvenil temprano. Un cambio en la pauta de anchuras de los incrementos (es decir, zonas incrementales estrechas y más anchas) también ocurrió a partir del noveno o décimo incremento en la mayoría de los otolitos (Figs. 4 y 6) y quizás refleje un cambio en el crecimiento somático durante la metamorfosis juvenil. La microestructura de los otolitos reflejó la etapa larval planctónica y la metamorfosis juvenil en el burro francés, *Haemulon flavolineatum*, (Brothers y McFarland, 1981) y en dos especies de peces de arrecife tropicales (Victor, 1982). Además, una disminución en la anchura de incrementos en peces larvales y juveniles ocurrió en estudios de campo y de laboratorio durante períodos de cambios en la dieta (Eckmann y Rey, 1987), privación de alimento (Volk *et al.*, 1984; Neilson y Geen, 1985; Eckmann y Rey, 1987; Butler, 1989; Karakiri y Hammer, 1989; Maillet y Checkley, 1990), y temperatura de agua reducida (Gutiérrez y Morales-Nin, 1986; Eckmann y Rey, 1987; Karakiri y Hammer, 1989; Brothers, 1990). Las variaciones en la anchura de los incrementos en los otolitos del barrilete negro podrían ser afectadas similarmente por la metamorfosis y pequeñas fluctuaciones en la disponibilidad de alimento o temperatura. Son necesarios más estudios diseñados para examinar estas relaciones.

Validación de edad

El experimento de marcado de otolitos indica que los incrementos se forman diariamente en las ságitas de barriletes negros de TE entre 12.6 y 39.6 mm cuando los peces son expuestos a un fotoperíodo natural y alimentados con cantidades moderadas de zooplancton salvaje. Otros factores experimentales pueden afectar la deposición de incrementos. Los efectos de temperatura y nivel de alimento son específicos por especie, y pueden afectar la formación diaria de incrementos en los otolitos de larvas y juveniles tempranos (Campana y Neilson, 1985; Neilson y Geen, 1985; Eckmann y Rey, 1987; Bailey y Stehr, 1988; Karakiri y Hammer, 1989; Maillet y Checkley, 1990; Hales y Hurley, 1991). Aunque las fluctuaciones de temperatura no fueron controladas durante este experimento, y variaron hasta 3.4°C en un período de 24 horas, no parecieron afectar el ritmo diario de la formación de incrementos.

Los resultados del experimento de inmersión demuestran además que THCL es un fluorocromo adecuado para marcar otolitos y validar la edad de larvas de postflexión y juveniles tempranos de barrilete negro. Ni la supervivencia de los peces (Tabla 2) ni la tasa de deposición de incrementos (Tabla 3) fue afectada por la duración de la inmersión (períodos de 6 y 12 horas) en una solución de 200 mg/L de THCL. Un aumento en el tiempo de exposición de 6 a 12 horas, empero, mejoró la calidad de la marca. La incorporación rápida de THCL dentro de 6 horas después de la inmersión permite estimaciones de edad precisas de barriletes negros larvales y juveniles tempranos.

La ubicación de la marca de tetraciclina en la zona incremental correspondiente al período de inmersión y el número de incrementos completos después de la marca indican una pauta diaria de crecimiento incremental que se forma al comienzo de una fase de luz y termina pocas horas antes

de comenzar la fase siguiente. Esta pauta de crecimiento incremental es similar a aquella reportada para pececillos, *Carassius auratus* (Mugiya *et al.*, 1981), y tilapias, *Tilapia nilotica* (Tanaka *et al.*, 1981). En contraste, análisis de incrementos marginales de larvas de atunes pleuronectos (Jenkins, 1987) y aleta azul del sur (Jenkins y Davis, 1990) indicaron que los incrementos diarios se formaron entre el fin de una fase de luz y el fin de la próxima. Aunque los métodos directos de validación usados en este experimento no fueron aplicados bajo condiciones completamente naturales en el laboratorio, la probabilidad de error en la determinación de la formación diaria de incrementos parece menor con métodos directos (marcado químico o validación de edad conocida) que con métodos indirectos (De Vries *et al.*, 1990; Jenkins, 1987; Jenkins y Davis, 1990).

No se determinó en este estudio el momento de la formación del primer incremento en los otolitos de larvas de barrilete negro. Sin embargo, Radtke (1983) informó que incrementos fueron observados en las ságitas de barriletes larvales un día después de ser criados. Aunque esto no ha sido confirmado para otras especies en la tribu Thunnini, los resultados de la validación para esta especie estrechamente relacionada indican que el momento de la formación del primer incremento quizás sea similar en los otolitos de larvas del barrilete negro. Típicamente, el desarrollo temprano de las distintas especies de atunes tropicales es similar, y es posible que la formación de incrementos en los otolitos sea asimismo similar (Brothers *et al.*, 1983). Una demora en la formación del primer incremento causaría subestimaciones de las edades y afectaría la interpretación biológica del modelo de crecimiento para el barrilete negro. El modelo predice que la TE de cría de barriletes negros es 2.01 mm (\pm 0.40 DE), igual a aquella de la bacoreta oriental, *Euthynnus affinis* (Delsman, 1926) y que cae dentro de los rangos de talla de cría reportados para la bacoreta, *Euthynnus alletteratus* (1.8-3.0 mm de talla del notocordio, Mayo 1973; y, 2.5-3.0 mm de talla total, Houde y Richards 1969; Richards 1989). Sin embargo, es posible que la desviación estándar grande del intercepto de la ecuación de crecimiento indique variabilidad en la talla o edad del barrilete negro a la cual se forma el primer incremento. No obstante, un error de uno o dos días a partir del momento de formación del primer incremento no cambiaría la tasa de crecimiento calculada a partir del modelo de crecimiento.

Crecimiento

Este estudio proporciona las primeras estimaciones de crecimiento *in situ* para escómbridos larvales y juveniles tempranos en el Océano Pacífico oriental. La tasa de crecimiento media de 0.70 mm/día estimada para barriletes negros larvales y juveniles tempranos cae dentro del rango de tasas de crecimiento *in situ* reportadas para larvas y juveniles de otros escómbridos tropicales y subtropicales obtenidas a partir de análisis de incrementos en otolitos. Tasas de crecimiento más bajas han sido reportadas para larvas en preflexión y flexión de atunes aleta azul del sur (0.32 mm/día) (Jenkins y Davis, 1990) y aleta amarilla (0.47 mm/día) (Lang, 1991), y de carite (0.47 mm/día) (Collins *et al.*, 1988). En contraste, tasas de crecimiento más elevadas han sido estimadas para larvas en flexión y postflexión del carite lucio (0.89 mm/día) y larvas en flexión y postflexión y juveniles tempranos del carite del Atlántico (1.15 mm/día) (De Vries *et al.*, 1990).

El amplio rango de tasas de crecimiento reportadas para escómbridos larvales y juveniles tempranos podría ser debido a crecimiento específico por etapa y morfología. El crecimiento de larvas de melvas, *Auxis* spp. (Harada *et al.*, 1973), aleta amarilla (Harada *et al.*, 1980), y caballa del Pacífico (Hunter y Kimbrell, 1980) criadas en el laboratorio de huevos artificialmente fertilizados, y de aleta azul del sur descrito a partir de análisis de campo es típicamente lento y casi lineal durante las etapas larvales tempranas de desarrollo (preflexión y flexión), pero aumenta con rapidez durante las últimas etapas. Además, es posible que la morfología general determine el tipo de gradiente de crecimiento de una especie (Fuiman, 1983). El crecimiento de algunas especies de escómbridos alargadas, tales como *Scomberomorus* spp. y *Auxis* spp., podría estar concentrado en la talla, y no en la profundidad

y/o anchura, durante las etapas tempranas de desarrollo. En contraste, es posible que el crecimiento de especies más robustas (por ejemplo, *Euthynnus* spp. y *Thunnus* spp.) sea más pronunciado en profundidad y anchura. Ya que la morfología específica por especie podría afectar las tasas de crecimiento de los escómbridos, los estudios de crecimiento deberían incluir estimaciones de crecimiento específicas por peso, adicionales a estimaciones basadas en talla.

Es posible que diferencias inter- e intraespecíficas en el crecimiento estén relacionadas también con la distribución de larvas y juveniles de escómbridos en distintos sistemas oceánicos y de afloramiento nerítico. Larvas de aleta azul del sur de aguas oligotróficas del Océano Índico oriental (Jenkins y Davis, 1990) tienen tasas de crecimiento más bajas que larvas de aleta amarilla de las aguas eutróficas del Golfo de México cerca del penacho de descarga del Río Misisipí (Lang, 1991). Lang (1991) estimó también tasas de crecimiento más bajas para larvas de aleta amarilla en aguas frontales del penacho del Río Misisipí que para aquellas ubicadas en la plataforma continental, donde se propuso que ocurrió predación selectiva por talla. A pesar de diferencias inter- e intraespecíficas en el crecimiento, las etapas de desarrollo tempranas de escómbridos en mares tropicales y subtropicales son generalmente caracterizadas por tasas de crecimiento potencialmente más elevadas y variables que aquellas de peces en latitudes más templadas (Houde, 1989).

La tasa de crecimiento estimada para barriletes negros larvales y juveniles tempranos es ligeramente más baja que lo que se esperaría para este especie, dados su potencial de crecimiento en cautiverio (Clemens, 1956; Olson y Scholey, 1990) y su distribución en aguas temporalmente variables, pero bastante productivas, del Océano Pacífico oriental (Blackburn *et al.*, 1970, Fiedler *et al.*, 1991). Clemens (1956) obtuvo una tasa de crecimiento media en talla de entre 3.1 y 3.6 mm/día para 10 juveniles tempranos alimentados con una cantidad no especificada de alimento durante 12 días de cautiverio. Olson y Scholey (1990) obtuvieron asimismo tasas de crecimiento altas pero variables de entre 1.0 y 4.8 mm/día para larvas tardías y juveniles tempranos alimentados hasta saciarse durante 15 días. Se mantuvieron estas tasas de crecimiento elevadas durante entre 15 y 50 días en cautiverio, y posteriormente disminuyeron. Estas tasas de crecimiento obtenidas en el laboratorio representan probablemente el potencial máximo de crecimiento del barrilete negro y quizás no las tasas naturales en el campo.

No obstante, las tasas de crecimiento obtenidas en el laboratorio proporcionan evidencia de que barriletes negros capturados de noche con luz submarina están creciendo a aproximadamente 70% o menos de su potencial. Causas posibles por la tasa de crecimiento más baja observada en la naturaleza son: 1) disponibilidad de alimento (es decir, crecimiento limitado por alimento); 2) gastos metabólicos asociados con evitar predadores y buscar presas; 3) mortalidad selectiva por talla de individuos de crecimiento rápido; 4) uso de artes de muestreo que seleccionan los individuos de crecimiento lento; o 5) cambios alométricos en la morfometría del cuerpo durante la metamorfosis. No hay ninguna evidencia de que esté muriendo un número desproporcionado de individuos de crecimiento rápido, ni tampoco parece probable que el método de captura esté sesgado hacia individuos de crecimiento lento, dado que son necesarias tasas de ingestión relativamente altas para la supervivencia de larvas en mares cálidos (Houde, 1989). Además, índices de la condición nutritiva de barriletes negros larvales en postflexión y juveniles tempranos indicaron que la mayoría de los individuos capturados con el mismo método durante la temporada de lluvias en 1988 en el Golfo de Panamá estuvieron en buena condición (Margulies, 1992). Por lo tanto, aunque sería fácil capturar individuos de crecimiento más lento y en mala condición, éstos aparentemente no están representados en las capturas realizadas de noche con luz submarina. Una reducción a corto plazo en el crecimiento no es aparente durante la metamorfosis entre las etapas de postflexión larval y juvenil temprano en el laboratorio (Olson y Scholey, 1990). Sin embargo, hay ciertos indicios en la morfología y microestructura de los otolitos de que podrían ocurrir breves períodos de crecimiento más lento en

peces en el mar durante la metamorfosis a juvenil temprano (ver la discusión previa de la morfología de los otolitos). Las explicaciones más verosímiles de las estimaciones más bajas de la tasa de crecimiento del barrilete negro en la naturaleza son irregularidad en la abundancia de las presas, niveles de alimento más bajos en el ambiente, y los altos niveles de actividad y energía necesarios para evadir predadores y buscar organismos de presa (Hunter, 1981).

Las diferencias en el crecimiento no fueron estadísticamente significativas entre la temporada de sequía y afloramiento y la temporada de lluvias, a pesar de las diferencias reportadas en los niveles de productividad en el Golfo de Panamá durante las dos temporadas (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969; Anónimo, 1992). Estudios previos (Forsbergh, 1963; Forsbergh, 1969) y más recientes (Anónimo, 1992) indican que los niveles de productividad primaria y secundaria fueron 2-3 veces más altas en la temporada de sequía que en la de lluvias. La tasa de crecimiento más alta observada para peces de entre 8 y 14 días de edad durante la temporada de lluvias (Fig. 11) podría ser solamente un artefacto de muestreo debido a la pequeñez de las muestras. Independientemente de las limitaciones de los datos, las larvas de etapa tardía y juveniles tempranos parecen ser capaces de alimentarse adecuadamente aún durante períodos de productividad más baja, cuando los organismos de presa estén posiblemente irregularmente distribuidos (Owen 1989). Aunque los otolitos crecían al mismo paso en relación a la talla del pez en cada temporada, los peces muestreados en la temporada de lluvias tenían otolitos relativamente más grandes que aquellos de la temporada de sequía. Varios estudios (Mosegaard *et al.*, 1988; Reznick *et al.*, 1989; Secor y Dean, 1989; Casselman, 1990; Wright, *et al.*, 1990; Moksness, 1992; Secor y Dean, 1992) han demostrado que otolitos más grandes son indicativos de crecimiento más lento. Ya que no fue evidente un crecimiento más lento en larvas en postflexión y juveniles muestreados durante la temporada de lluvias, es posible que haya ocurrido durante las etapas de desarrollo más tempranas. Margulies (1992) observó una incidencia de inanición más alta en larvas de preflexión que en las de postflexión durante la temporada de lluvias en 1988, lo cual sugiere que variaciones temporales en la disponibilidad de alimento y/o temperatura podrían ejercer un efecto pronunciado sobre la nutrición y supervivencia de larvas en etapa de preflexión y podrían también afectar el crecimiento durante el desarrollo temprano. Aunque es evidente que los otolitos fueron más grandes en los peces muestreados durante la temporada de lluvias, la varianza de las relaciones de crecimiento para cada temporada fue grande en relación al rango de datos disponibles, señalando la necesidad de obtener más muestras y realizar más análisis de diferencias temporales en el crecimiento de todas las etapas tempranas de vida.

Una correspondencia estrecha entre el crecimiento somático y de los otolitos a nivel diario es útil para retrocalcular el crecimiento específico por etapa y edad usando medidas de la anchura de los incrementos. Sin embargo, ya que había un indicio de diferencias temporales en la relación del crecimiento somático y de los otolitos en el barrilete negro, una relación lineal sencilla entre la talla del pez y el tamaño del otolito introduciría un sesgo en los procedimientos de retrocálculo (Campana, 1990). Se deberían desarrollar modelos de regresión más complejos que incorporen edad (Secor y Dean, 1992) y temperatura (Mosegaard *et al.*, 1989).

La mayor variabilidad en el crecimiento de barriletes negros juveniles tempranos de mayor edad muestreados durante la temporada de lluvias podría reflejar variabilidad en la transición a una dieta piscívora y en la distribución espacial (es decir, irregularidad) de las presas. Estudios de cría en cautiverio indican que larvas en postflexión y juveniles tempranos son capaces de cambiar de una dieta de zooplancton a una de peces, resultando en tasas de crecimiento altas pero variables (Olson y Scholey, 1990). Además, observaciones en el laboratorio (Margulies, 1992; este estudio) indican que larvas en postflexión aceptan zooplancton en su dieta sin dificultad, pero también se vuelven caníbales durante las etapas de postflexión y juvenil temprano. Adicionalmente, la mayoría de las especies de escómbridos estudiadas empiezan a ser piscívoras y caníbales durante la etapa de postflexión (Mayo,

1973; Hunter y Kimbrell, 1980; Young y Davis, 1990) y durante las etapas de desarrollo más tempranas en el caso de *Scomberomorus* spp. (Jenkins *et al.*, 1984; Finucane *et al.*, 1990). Es posible que una dieta de peces brinde una ventaja de crecimiento a los individuos que cambian de una dieta de zooplancton, y que el comienzo y la intensidad de la ictiofagia corresponda a la distribución espacial de las presas, resultando en crecimiento variable de individuos mayores durante la temporada de lluvias. Existe alguna evidencia de una distribución irregular de organismos de presa de larvas durante la temporada de lluvias en 1988 en el Golfo de Panamá, con base en la relación entre la inanición en larvas de barrilete negro tomadas en arrastres individuales y la ubicación y hora del muestreo (Margulies, 1992). La interacción de la irregularidad de alimento con las temperaturas del agua elevadas de la temporada de lluvias podría asimismo resultar en tasas de crecimiento altas pero variables. A temperaturas del agua más elevadas, las tasas de ingestión tienen que aumentar en reacción a tasas metabólicas elevadas (Houde, 1989). Por lo tanto, el crecimiento variable podría resultar del grado e intensidad del éxito de alimentación cuando las temperaturas son elevadas y los organismos de presa están distribuidos irregularmente. Aunque hay indicios de un crecimiento más variable en individuos de mayor edad de la temporada de lluvias, se necesita más información para examinar la pertinencia de la irregularidad espacial a pequeña escala de los organismos de presa y la interacción de temperatura sobre el crecimiento de larvas y juveniles tempranos en el Golfo de Panamá.

Este estudio proporciona la primera descripción *in situ* del crecimiento de escómbridos larvales y juveniles tempranos en el Pacífico oriental. El análisis de la microestructura de los otolitos indica que los incrementos son depositados diariamente en las ságitas de barriletes negros larvales y juveniles tempranos y que se puede utilizar esta técnica de determinar la edad para estimar tasas de crecimiento. No fueron aparentes diferencias temporales en el crecimiento en barriletes negros larvales tardíos y juveniles tempranos, pero podrían haber ocurrido durante etapas larvales previas, tal como indican las diferencias entre las dos temporadas en el tamaño del otolito en relación a la talla del pez. Los otolitos desproporcionadamente mayores de los peces muestreados en la temporada de lluvias indican que el crecimiento somático y de los otolitos no debe ser representado por una relación lineal sencilla y que se deben aplicar modelos más complejos en procedimientos de retrocálculo. Actualmente se están aplicando la técnica de determinación de edad usando otolitos y los análisis del crecimiento subsecuente a todas las etapas tempranas de vida, y es posible que contribuyan de forma importante a la comprensión de la supervivencia y dinámica de reclutamiento de los escómbridos en el Pacífico oriental.

RECONOCIMIENTOS

Se reconoce con agradecimiento la asistencia en el campo y el laboratorio de varios miembros del personal de la Comisión en Achotines, particularmente D. Ballesteros, A. Cano, E. Espinoza, R. Lauth, D. Margulies, M. Samaniego, D. Soliz, V. Scholey, y P. Vergara. A lo largo de este estudio D. Margulies proporcionó ánimo constante y discusiones útiles sobre la ecología de peces larvales. Los experimentos de inmersión preliminares fueron realizados por R. Lauth, D. Margulies, y V. Scholey. J. Butler, T. Foreman, y A. Wild brindaron apoyo durante el desarrollo inicial de técnicas y la interpretación de la microestructura de otolitos. T. Foreman ayudó en la confirmación de incrementos diarios. Varias colegas, particularmente D. DeMaster, T. Foreman, D. Margulies, R. Owen, K. Schaefer, P. Tomlinson, y A. Wild, proporcionaron sugerencias útiles y discusiones fructíferas. Quisiera agradecerles a W. Bayliff, J. Butler, R. Deriso, D. Margulies, D. Secor, N. Webb, A. Wild, y M. Yoklavich las revisiones críticas del manuscrito, y a K. Reichardt y N. Webb la traducción del manuscrito al castellano. Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento al Director de la Comisión, J. Joseph, y al Científico Dirigente del Programa Atún-Picudo, R. Deriso, por su apoyo de esta investigación.

LITERATURE CITED—BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ahlstrom, E.H., J.L. Butler, and B.Y. Sumida. 1976. Pelagic stromateoid fishes (Pisces, Perciformes) of the eastern Pacific: kinds, distributions, and early life histories and observations on five of these from the northwest Atlantic. *Bull. Mar. Sci.* 26: 285-402.
- Anonymous. 1992. Annual report of the Inter-American Tropical Tuna Commission 1990: 261 pp.
- Bailey, K.M. and C.L. Stehr. 1988. The effects of feeding periodicity and ration on the rate of increment formation in otoliths of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122: 147-161.
- Blackburn, M., R.M. Laurs, R.W. Owen, and B. Zeitzschel. 1970. Seasonal and areal changes in standing stocks of phytoplankton, zooplankton and micronekton in the eastern tropical Pacific. *Mar. Biol.* 7: 14-31.
- Brothers, E.B. 1990. Otolith marking. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7: 183-202.
- Brothers, E.B. and W.N. McFarland. 1981. Correlations between otolith microstructure, growth, and life history transitions in newly recruited French grunts [*Haemulon flavolineatum* (Desmarest), Haemulidae]. *Rapp. P-V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 178: 369-374.
- Brothers, E.B., E.D. Prince, and D.W. Lee. 1983. Age and growth of young-of-the-year bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, from otolith microstructure. U.S. Nat. Oceanic Atmos. Adm., Tech. Rep. Nat. Mar. Fish. Serv., Circ. 8: 49-59.
- Butler, J.L. 1989. Growth during the larval and juvenile stages of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, in the California Current during 1980-84. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 87: 645-652.
- Calkins, T.P. and W.L. Klawe. 1963. Synopsis of biological data on black skipjack, *Euthynnus lineatus* Kishinouye 1920. *FAO Fish. Rep.* 6: 130-146.
- Campana, S.E. 1990. How reliable are growth back-calculations based on otoliths? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 2219-2227.
- Campana, S.E. and J.D. Neilson. 1985. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1014-1032.
- Campana, S.E., J.A. Gagné, and J. Munro. 1987. Otolith microstructure of larval herring (*Clupea harengus*): image or reality? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1922-1929.
- Casselman, J.M. 1990. Growth and relative size of calcified structures of fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 673-688.
- Clemens, H.B. 1956. Rearing larval scombrid fishes in shipboard aquaria. *Calif. Fish Game* 42: 69-79.
- Collette, B.B. and C.E. Nauen. 1983. *FAO species catalogue. Vol. 2, Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species known to date.* *FAO Fish. Synop.* 125, 2: 137 pp.
- Collins, M.R., D.J. Schmidt, C.W. Waltz, and J.L. Pickney. 1988. Age and growth of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, from the Atlantic coast of the United States. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 87: 49-61.

- Delsman, H.C. 1926. Fish eggs and larvae from the Java Sea. 9. *Scomber kanagurta* C.V. Treubia 8: 395-399.
- DeMaster, D.P. and J.K. Drevenak. 1988. Survivorship patterns in three species of captive cetaceans. Mar. Mamm. Sci. 4: 297-311.
- De Vries, D.A., C.B. Grimes, K.L. Lang, and D.B. White. 1990. Age and growth of king and Spanish mackerel larvae and juveniles from the Gulf of Mexico and U.S. South Atlantic Bight. Envir. Biol. Fish. 29: 135-143.
- Draper, N.R. and H. Smith. 1981. Applied regression analysis. John Wiley and Sons, NY: 709 pp.
- Eastman Kodak Co. 1980. Photography through the microscope. Eastman Kodak Co., Rochester, NY: 96 pp.
- Eckmann, R. and P. Rey. 1987. Daily increments on the otoliths of larval and juvenile *Coregonus* spp., and their modification by environmental factors. Hydrobiologia 148: 137-143.
- Fiedler, P.C., V. Philbrick, and F.P. Chavez. 1991. Oceanic upwelling and productivity in the eastern tropical Pacific. Limnol. Oceanogr. 36: 1834-1850.
- Finucane, J.H., C.B. Grimes, and S.P. Naughton. 1990. Diets of young king and Spanish mackerel off the Southeast United States. Northeast Gulf Sci. 11: 145-153.
- Forsbergh, E.D. 1963. Some relationships of meteorological, hydrographic, and biological variables in the Gulf of Panama. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 7: 1-109.
- Forsbergh, E.D. 1969. On the climatology, oceanography and fisheries of the Panama Bight. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 14: 45-385.
- Fuiman, L.A. 1983. Growth gradients in fish larvae. J. Fish. Biol. 23: 117-123.
- Gutiérrez, E. and B. Morales-Nin. 1986. Time series analysis of daily growth in *Dicentrarchus labrax* L. otoliths. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 103: 163-179.
- Hales, L.S., Jr. and D.H. Hurley. 1991. Validation of daily increment formation in the otoliths of juvenile silver perch, *Bairdiella chrysoura*. Estuaries 14: 199-206.
- Harada, T., O. Murata, and H. Furutani. 1973. On the artificial rearing of larvae in marusoda, *Auxis tapeinosoma*. Kinki Univ. Fac. Agric. Bull. 6: 113-116.
- Harada, T., O. Murata, and S. Miyashita. 1973. On the artificial rearing of larvae in hirasoda, *Auxis thazard*. Kinki Univ. Fac. Agric. Bull. 6: 109-112.
- Harada, T., O. Murata, and S. Oda. 1980. Rearing of and morphological changes in larvae and juveniles of yellowfin tuna. Kinki Univ. Fac. Agric. Bull. 13: 33-36. [Engl. transl. no. 51 by T. Otsu, 1980, 8 pp., avail. Honolulu Lab, Southwest Fish. Cent., Nat. Mar. Fish. Serv., NOAA, Honolulu, HI 96822-2396].
- Houde, E.D. 1978. Critical food concentrations for larvae of three species of subtropical marine fishes. Bull. Mar. Sci. 28: 395-411.
- Houde, E.D. 1987. Fish early life dynamics and recruitment variability. Am. Fish. Soc. Symp. 2: 17-29.

- Houde, E.D. 1989. Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 87: 471-495.
- Houde, E.D. and W.J. Richards. 1969. Rearing larval tunas in the laboratory. Commer. Fish. Rev. 31: 32-34.
- Hunter, J.R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In Lasker, R. (editor). Marine fish larvae. Washington Sea Grant Program, Seattle, WA: 33-77.
- Hunter, J.R. and C.M. Kimbrell. 1980. Early life history of Pacific mackerel, *Scomber japonicus*. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 78: 89-101.
- Jenkins, G.P. 1987. Age and growth of co-occurring larvae of two flounder species, *Rhombosolea tapirina* and *Ammotretis rostratus*. Mar. Biol. 95: 157-166.
- Jenkins, G.P. and T.L.O. Davis. 1990. Age, growth rate, and growth trajectory determined from otolith microstructure of southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 63: 93-104.
- Jenkins, G.P., N.E. Milward, and R.F. Hartwick. 1984. Food of larvae of Spanish mackerels, genus *Scomberomorus* (Teleostei: Scombridae), in shelf waters of the Great Barrier Reef. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 35: 477-482.
- Jenkins, G.P., J.W. Young, and T.L.O. Davis. 1991. Density dependence of larval growth of a marine fish, the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1358-1363.
- Jennings, S. 1991. The effects of capture, net retention and preservation upon lengths of larval and juvenile bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J. Fish Biol. 38: 349-357.
- Jones, C. 1986. Determining age of larval fish with the otolith increment technique. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 84: 91-103.
- Karakiri, M. and C. Hammer. 1989. Preliminary notes on the formation of daily increments in otoliths of *Oreochromis aureus*. J. Appl. Ichthyol. 5: 53-60.
- Kendall, A.W., Jr. and D. Gordon. 1981. Growth rate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) larvae in the Middle Atlantic Bight. Rapp. P.-V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer. 178: 337-341.
- Klawe, W.L. 1963. Observations on the spawning of four species of tuna (*Neothunnus macropterus*, *Katsuwonus pelamis*, *Auxis thazard* and *Euthynnus lineatus*) in the eastern Pacific Ocean, based on the distribution of their larvae and juveniles. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 6: 447-540.
- Klawe, W.L., J.J. Pella, and W.S. Leet. 1970. The distribution, abundance and ecology of larval tunas from the entrance to the Gulf of California. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 14: 506-544.
- Lang, K.L. 1991. Variations in the age and growth of larval yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, collected about the Mississippi River plume. M.S. Thesis, Texas A&M University, College Station, Texas: 73 pp.
- Lorson, R.D. and V.A. Mudrak. 1987. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry. North Am. J. Fish. Manag. 7: 453-455.

- Maillet, G.L. and D.M. Checkley, Jr. 1990. Effects of starvation on the frequency of formation and width of growth increments in sagittae of laboratory-reared Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* larvae. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 88: 155-165.
- Margulies, D. 1993. Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: Scombridae) in the Panama Bight. Mar. Biol. 115: 317-330.
- Mayo, C.A. 1973. Rearing, growth, and development of the eggs and larvae of seven scombrid fishes from the Straits of Florida. Ph.D. Dissertation, University of Miami, Coral Gables, Florida: 128 pp.
- Moksness, E. 1992. Differences in otolith microstructure and body growth rate of North Sea herring (*Clupea harengus* L.) larvae in the period 1987-1989. ICES J. Mar. Sci. 49: 223-230.
- Mosegaard, H., H. Svedang, and K. Taberman. 1988. Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1514-1524.
- Moser, H.G., E.H. Ahlstrom, D. Kramer, and E.G. Stevens. 1974. Distribution and abundance of the fish eggs and larvae in the Gulf of California. Calif. Coop. Ocean. Fish. Inves., Rep., 17: 112-128.
- Mugiya, Y., N. Watabe, J. Yamada, J.M. Dean, D.G. Dunkelberger, and M. Shimizu. 1981. Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. 68A: 659-662.
- Neilson, J.D. and G.H. Geen. 1985. Effects on feeding regimes and diel temperature cycles on otolith increment formation in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 83: 91-101.
- Nishikawa, Y., M. Honma, S. Ueyanagi, and S. Kikawa. 1985. Average distribution of larvae of oceanic species of scombroid fishes, 1956-1981. Far Seas Fish. Res. Lab., S Ser., 12: 99 pp.
- Olson, R.J. and V.P. Scholey. 1990. Captive tunas in a tropical marine research laboratory: growth of late-larval and early-juvenile black skipjack *Euthynnus lineatus*. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 88: 821-828.
- Olvera Limas, R.M., J.A. García Borbón, J.L. Cerecedo Escudero, and R. Sánchez Regalado. 1990. Distribucion y abundancia de las larvas de melva *Auxis thazard* y de barrilete negro *Euthynnus lineatus* (Pisces, Scombridae) y biomasa reproductora de la melva *Auxis thazard* en el Pacifico Oriental Mexicano. Ciencia Pesquera, Inst. Nal. de la Pesca, Sría. de Pesca, México, 7: 59-80.
- Owen, R.W. 1989. Microscale and finescale variations of small plankton in coastal and pelagic environments. J. Mar. Res. 47: 197-240.
- Radtke, R.L. 1983. Otolith formation and increment deposition in laboratory-reared skipjack tuna, *Euthynnus pelamis*, larvae. U.S. Nat. Oceanic Atmos. Adm., Tech. Rep. Nat. Mar. Fish. Serv. Circ. 8: 99-103.
- Radtke, R.L. 1989. Larval fish age, growth, and body shrinkage: information available from otoliths. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1884-1894.

- Reznick, D., E. Lindbeck, and H. Bryga. 1989. Slower growth results in larger otoliths: an experimental test with guppies (*Poecilia reticulata*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 108-112.
- Richards, W.J. 1989. Preliminary guide to the identification of the early life history stages of scombroid fishes of the western central Atlantic. U.S. Nat. Oceanic Atmos. Adm., Tech. Rep. Nat. Mar. Fish. Serv. 240: 101 pp.
- Schaefer, K.M. 1987. Reproductive biology of black skipjack, *Euthynnus lineatus*, an eastern Pacific tuna. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 19: 169-260.
- Secor, D.H. and J.M. Dean. 1989. Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 113-121.
- Secor, D.H. and J.M. Dean. 1992. Comparison of otolith-based back-calculation methods to determine individual growth histories of larval striped bass, *Morone saxatilis*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1439-1454.
- Siegel, S. 1956. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill Book Co., Inc., NY: 312 pp.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. Statistical methods. Iowa State Univ. Press, Ames, IA: 593 pp.
- Tanaka, K., Y. Mugiya, and J. Yamada. 1981. Effects of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 79: 459-466.
- Theilacker, G.H. 1980. Changes in body measurements of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other fishes due to handling and preservation. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Fish. Bull. 78: 685-692.
- Victor, B.C. 1982. Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses, *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus*. Mar. Biol. 71: 203-208.
- Volk, E.C., R.C. Wissmar, C.A. Simenstad, and D.M. Eggers. 1984. Relationship between otolith microstructure and the growth of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) under different prey rations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 126-133.
- Watabe, N., K. Tanaka, J. Yamada, and J.M. Dean. 1982. Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 58: 127-134.
- Weber, D. and G.J. Ridgway. 1967. Marking Pacific salmon with tetracycline antibiotics. J. Fish. Res. Bd. Can. 24: 849-865.
- Wild, A. 1986. Growth of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, in the eastern Pacific Ocean based on otolith increments. Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull. 18: 423-482.
- Wright, P.J., N.B. Metcalfe, and J.E. Thorpe. 1990. Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L: evidence against coupling. J. Fish Biol. 36: 241-249.
- Yoshida, H.O. 1979. Synopsis of biological data on tunas of the genus *Euthynnus*. U.S. Nat. Oceanic Atmos. Adm., Tech. Rep. Nat. Mar. Fish. Serv. Circ. 429: 57 pp.
- Young, J.W. and T.L.O. Davis. 1990. Feeding ecology of larvae of southern bluefin, albacore and skipjack tunas (Pisces: Scombridae) in the eastern Indian Ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. 61: 17-29.
- Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ: 718 pp.